



HAL
open science

Écologie microbienne de la biominéralisation intracellulaire du carbonate de calcium par *Microcystis*, une genre de cyanobactérie formant des efflorescences

Juliette Gaëtan

► **To cite this version:**

Juliette Gaëtan. Écologie microbienne de la biominéralisation intracellulaire du carbonate de calcium par *Microcystis*, une genre de cyanobactérie formant des efflorescences. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP7235 . tel-04703666

HAL Id: tel-04703666

<https://theses.hal.science/tel-04703666v1>

Submitted on 20 Sep 2024

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.

UNIVERSITE PARIS CITE

École doctorale 474 Frontières de l'Innovation en Recherche et Education
Institut de minéralogie, de physique des matériaux et de cosmochimie
Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris

**Ecologie microbienne de la biominéralisation intracellulaire
du carbonate de calcium par *Microcystis*, une genre de
cyanobactérie formant des efflorescences**

Par Juliette Gaëtan

Thèse en écologie, évolution et biologie environnementale

Dirigée par Karim BENZERARA et Julie LELOUP

Présentée et soutenue publiquement le 28/09/2023

Devant un jury composé de :

Delphine LATOUR	Professeure, Université Clermont Auvergne	Rapportrice
Oleg POKROVSKY	Directeur de recherche CNRS, Université Toulouse III-Paul Sabatier	Rapporteur
Emilie LYAUTEY	Maître de conférence, Université Savoie Mont Blanc	Examinatrice
Marc BENEDETTI	Professeur, Université Paris Cité	Examineur
Karim BENZERARA	Directeur de recherche CNRS, Sorbonne Université	Directeur de thèse
Julie LELOUP	Maître de conférence, Sorbonne Université	Directrice de thèse



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

Résumé

Mots-clés : biominéralisation, iACC, Microcystis, CaCO₃, bloom, microbiologie environnementale, microscopie électronique, chimie des solutions, expression de gènes

Les cyanobactéries sont connues depuis longtemps comme des organismes photosynthétiques qui ont induit la formation de dépôts massifs de carbonate au cours des temps géologiques. On a longtemps pensé que le processus de biominéralisation était exclusivement extracellulaire et non contrôlé génétiquement. Cependant, la biominéralisation de carbonates de calcium amorphes intracellulaires (iACC) a été récemment découverte chez des cyanobactéries phylogénétiquement diverses. Ce processus de biominéralisation est lié à un gène orphelin, appelé *ccyA*, en plus de se produire intracellulairement et dans des conditions thermodynamiques défavorables. Le réservoir intracellulaire de C et de Ca ainsi formé a clairement une influence sur la biologie des cellules, mais nous ignorons sa fonction. En outre, l'importance de l'impact du processus biologique sur les cycles géochimiques reste inconnue.

Microcystis est un genre de cyanobactérie présent dans les eaux douces et souvent impliqué dans des efflorescences toxiques. Ce genre a été intensément étudié pour les mécanismes moléculaires de la production de toxines, la diversité génétique de ses populations, et la dynamique et le déterminisme de ses efflorescences. Nous avons récemment détecté une diversité phénotypique et géotypique dans le genre Microcystis vis-à-vis de la biominéralisation d'iACC : plusieurs souches disponibles dans les collections de culture forment des iACC et contiennent le gène *ccyA* alors que d'autres n'en contiennent pas. C'est pourquoi nous proposons ici d'étudier la biominéralisation iACC dans le genre Microcystis comme un cas très original où un processus minéralogique peut influencer la dynamique et la structure géotypique de populations microbiennes et où, à son tour, cette dynamique de population peut avoir un impact sur le cycle géochimique du Ca. Plus spécifiquement, nous avons l'intention de déterminer si (i) la formation d'iACC est un phénomène répandu dans le genre Microcystis ; (ii) les iACC dans les populations de Microcystis constituent un réservoir géochimique important dans les écosystèmes d'eau douce en prolifération ; (iii) il existe une dynamique temporelle de ce réservoir de Ca liée à celle des cyanobactéries (iv) si le gène marqueur est exprimé dans Microcystis et (v) si d'autres acteurs moléculaires dans le processus de biominéralisation peuvent être identifiés en examinant la co-expression d'autres gènes avec celui de *ccyA*. Ce projet interdisciplinaire combine des approches de microbiologie, de transcriptomique, de géochimie des solutions et de minéralogie/microscopie.

Abstract

Keywords: biomineralisation, iACC, Microcystis, CaCO₃, bloom, environmental microbiology, electronic microscopy, aqueous chemistry, gene expression

Cyanobacteria have long been known as photosynthetic organisms which have induced the formation of massive carbonate deposits throughout geological times. It has long been thought that the biomineralization process was exclusively extracellular and not genetically controlled. However, the biomineralization of intracellular amorphous calcium carbonate (iACC) has been recently discovered in widespread and phylogenetically diverse cyanobacteria. In this case, biomineralization is related to an orphan gene called *ccyA*, in addition to occurring intracellularly and under out-of-equilibrium thermodynamic conditions. The so-formed intracellular reservoir of C and Ca clearly has an influence on the biology of the cells but we ignore its function. Moreover, the significance of the impact of the biological process on global geochemical cycles remains unknown.

Microcystis is a cyanobacterial genus occurring in freshwater and often involved in toxic blooms. This genus has been intensely studied for the molecular mechanisms of toxin production, the genetic diversity of its populations, and the dynamics and determinism of its blooms. We recently detected a novel phenotypic and genotypic diversity in the Microcystis genus regarding intracellular biomineralization: several strains available in culture collections form iACC and contain *ccyA* while others do not. This is why we propose in this thesis to study iACC biomineralization in the Microcystis genus as a very original case where a mineralogical process may influence the dynamics and genotypic structure of microbial populations and in turn where these population dynamics may impact the geochemical cycle of Ca. More specifically, we intend to determine if (i) iACC formation is a widespread phenomenon in Microcystis genus; (ii) iACC in Microcystis populations make a significant geochemical reservoir in freshwater ecosystems experiencing blooming; (iii) there is a temporal dynamic of this Ca reservoir linked with that of cyanobacterial (iv) if the marker gene is expressed in Microcystis and (v) if other molecular actors in the biomineralization process can be pinpoint by looking at the co-expression of other gene with that of *ccyA*. This interdisciplinary project combines microbiology, transcriptomic, solution geochemistry, and mineralogy/microscopy approaches.

Table des matières

Chapitre 1 : Contexte de l'étude	7
1 Importance et diversité de la biominéralisation	9
1.1 Définitions	9
1.2 La biominéralisation du CaCO ₃	10
2 La biominéralisation d'iACC chez les cyanobactéries	13
2.1 Métabolisme des cyanobactéries	13
2.2 Distribution environnementale et phylogénétique des cyanobactéries formant des iACC	14
2.3 Importance quantitative du piégeage de Ca	14
2.4 Mécanismes de formation des iACC chez les cyanobactéries	16
2.5 Contrôles moléculaires de la formation d'iACC chez les cyanobactéries : le gène <i>ccyA</i>	17
2.6 Rôle putatif des iACC	18
3 La biominéralisation d'iACC chez une cyanobactérie formant des efflorescences	18
3.1 <i>Microcystis</i> , un genre de cyanobactéries particulièrement étudié	19
3.2 Diversité intra-genre	20
3.3 Efflorescences formées par <i>Microcystis</i>	21
4 Déterminisme des blooms et écologie de <i>Microcystis</i>	22
4.1 Température	22
4.2 Flottabilité et stratification des lacs	22
4.3 Importance du phosphore et de l'azote dans la dynamique des populations de <i>Microcystis</i>	23
4.4 Dynamique des blooms	23
5 Problématiques et objectifs de la thèse	24
6 Bibliographie du Chapitre 1	26
Chapitre 2 : La formation d'iACC est un phénomène répandu chez <i>Microcystis</i>	33
1 Abstract	38
2 Introduction	38
3 Experimental Procedures	39
3.1 Sampling sites	39
3.2 Cultures of cyanobacterial strains	40
3.3 Scanning electron microscopy (SEM)	40
3.4 Scanning transmission electron microscopy (STEM)	41
3.5 Genome sequencing and analyses	41
3.6 Search for <i>ccyA</i> in available genomes	42
3.7 Phylogenetic analyses	42
4 Results	42
4.1 Detection of iACC-forming <i>Microcystis</i> in lakes	42
4.2 Detection of both iACC and the <i>ccyA</i> gene in cultivated <i>Microcystis</i> strains isolated from a single lake	45
4.3 Search for full-length homologs of the <i>ccyA</i> gene in <i>Microcystis</i> genomes from public databases	47
5 Discussion	51
5.1 The overlooked prevalence of iACC biomineralization by <i>Microcystis</i>	51
5.2 Potential impacts on the Ca geochemical cycle	52
5.3 Phylogenetic distribution of <i>ccyA</i>	52
5.4 <i>Microcystis</i> within-population diversity based on <i>ccyA</i> presence/absence	53
6 Conclusions	55
7 Acknowledgments	55
8 Data availability statement	55

9 Bibliographie du chapitre 2.....	55
Chapitre 3 : Suivi temporel de Microcystis dans deux étangs d’Ile-de-France.....	59
1 Introduction.....	64
2 Matériels et Méthodes.....	66
2.1 Sites d’études.....	66
2.2 Echantillonnage.....	66
2.3 Dosage de la chlorophylle a, et identification et comptage du phytoplancton.....	68
2.4 Microscopie électronique à balayage (MEB).....	68
2.5 Microscopie électronique en transmission à balayage (STEM).....	70
2.6 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en réflectance totale atténuée (ATR-FTIR).....	70
2.7 Spectroscopie d’absorption des rayons X (XANES/EXAFS).....	70
2.8 Analyses élémentaires (ICP-AES).....	71
2.9 Mesures du carbone inorganique (DIC) et organique dissous (DOC).....	72
2.10 Analyses des nutriments N et P (colorimétrie).....	72
2.11 Extraction des ADN et ARN.....	73
2.12 Quantification des populations bactériennes, cyanobactériennes, et de Microcystis.....	73
2.13 Analyses des données.....	74
2.14 Statistiques.....	75
2.15 Analyse des compositions chimiques élémentaires globales sur la matière particulaire.....	75
3 Résultats.....	82
3.1 Site de Cergy.....	82
3.2 Site de l’étang de la Grosse Pierre (Verneuil).....	101
4 Discussion.....	110
4.1 Site de Cergy.....	110
4.2 Site de Verneuil.....	113
5 Conclusions.....	115
6 Bibliographie du Chapitre 3.....	116
Chapitre 4 : Expression du gène marqueur de la biominéralisation selon un cycle jour/nuit.....	121
1 Introduction.....	129
2 Materials and methods.....	130
2.1 Cultures and sampling.....	130
2.2 Nucleic acid extraction.....	131
2.3 Library Preparation and RNA Sequencing.....	131
2.4 Read processing. Raw.....	131
2.5 Differential expression analysis.....	132
2.6 Gene functional annotation.....	132
3 Results.....	132
3.1 Overall expression pattern.....	132
3.2 Expression of the ccyA gene.....	134
3.3 Search of differential gene expression during the day/night cycle.....	135
3.4 Genomic neighborhood of ccyA.....	137
3.5 Co-expression of other genes with ccyA gene.....	139
4 Discussion.....	142
5 Bibliographie du Chapitre 4.....	145
Chapitre 5 : Conclusions et perspectives.....	149
1 La biominéralisation d’iACC chez Microcystis.....	151
1.1 Un phénomène répandu au sein des espèces de Microcystis?.....	151
1.2 Un phénomène quantifiables à l’échelle de populations naturelles ?.....	152

1.3	<i>Un mécanisme identifiable à l'échelle d'une souche ?</i>	153
2	<i>Apport méthodologique à l'étude des iACC chez les cyanobactéries</i>	153
2.1	<i>Détection des ACC chez les cyanobactéries par FTIR</i>	154
2.2	<i>Spéciation et coordinence du calcium dans les iACC chez les cyanobactéries</i>	154
3	<i>Conclusion</i>	154
4	<i>Bibliographie Chapitre 5</i>	155

Liste des Figures

Figure 1.1 Diversité des biominéraux de CaCO ₃	10
Figure 1.2 Exemple de biominéralisation de CaCO ₃ intracellulaires amorphes.....	12
Figure 1.3 Mécanismes de concentration du CO ₂ chez les cyanobactéries.	14
Figure 1.4 Représentation graphique des concentrations de calcium dissous restant après 40-61 jours d'incubation pour les 52 souches testées par De Wever <i>et al.</i>	15
Figure 1.5 Biominéralisation d'iACC chez <i>Microcystis</i>	19
Figure 1.6 Efflorescences à <i>Microcystis</i>	20
Figure 2.1 SEM analyses of <i>Microcystis</i> forming iACC and PolyP granules in freshwater lakes.....	45
Figure 2.2 SEM analyses of <i>Microcystis</i> cells from La Portiña with some cells containing iACC inclusions and some not containing iACC.....	46
Figure 2.3 TEM analyses of <i>Microcystis</i> cells forming iACC and PolyP granules collected in freshwater lakes.....	46
Figure 2.4 SEM analyses of <i>Microcystis</i> cells forming PolyP only.	47
Figure 2.5 TEM analyses of <i>Microcystis</i> cultured strains.	49
Figure 2.6 Phylogenomic tree of <i>Microcystis</i>	50
Figure 3.1 Stratégie de l'étude terrain sur deux lacs de région parisienne.....	65
Figure 3.2 Lieux d'échantillonnage.	66
Figure 3.3 Méthodologie d'échantillonnage et d'analyse.....	69
Figure 3.4 Variation du pH (gris) et de la température (noir) en fonction du temps.....	83
Figure 3.6 Variation du P total et de la chlorophylle-a (vert) en fonction du temps.....	84
Figure 3.7 Variation du calcium dissous (Ca ²⁺) en fonction du temps.....	85
Figure 3.8 Variation de l'ammonium dissous (NH ₄ ⁺) en fonction du temps.....	85
Figure 3.9 Représentation dans les systèmes ternaires (HCO ₃ +CO ₃)-SO ₄ -Cl et Ca-Mg-(Na+K) et quaternaire (HCO ₃ +CO ₃)-(SO ₄ +Cl)-(Ca+Mg)-(Na+K) des eaux de Verneuil et Cergy.....	86
Figure 3.10 Evolution chimique des eaux de l'étang des Galets (Cergy) et l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil) dans une représentation dans les systèmes ternaires (HCO ₃ +CO ₃)-SO ₄ -Cl et Ca-Mg-(Na+K) et quaternaire (HCO ₃ +CO ₃)-(SO ₄ +Cl)-(Ca+Mg)-(Na+K).....	87
Figure 3.11 Diagramme de solubilité dans l'espace log(aCO ₃ ²⁻) en fonction du log(aCa ²⁺) pour le site de (A) Cergy et (B) Verneuil.....	87
Figure 3.12 Evolution du pH en fonction de l'a(CO ₃ ²⁻) et l'a(Ca ²⁺) pour le site de Cergy.....	88
Figure 3.13 Spectres d'absorption ATR-FTIR des échantillons de l'étang des Galets (Cergy) dans l'IR moyen.....	89
Figure 3.14 Analyse de la composition chimique élémentaire du particulaire (>0,22 µm) de l'étang des Galets (Cergy).	91
Figure 3.15 (A) Spectres XANES normalisés de la matière en suspension de l'étang des Galets (Cergy) et de calcite. (B) Spectres XANES dérivés de la matière en suspension de l'étang des Galets (Cergy) et de calcite.....	93
Figure 3.16 Analyses par microscopie électronique à balayage (MEB) représentatives de la diversité des phases riches en Ca l'étang des Galets (Cergy).	95
Figure 3.17 Analyses MEB d'échantillons provenant de l'étang des Galets (Cergy) de tests entiers ou partiels de <i>Phacotus</i> sp.....	97
Figure 3.18 Analyses MEB de <i>Microcystis</i> formant des granules iACC et PolyP dans l'étang des Galets (Cergy) 98	98

Figure 3.19 Proportion relatives des principales cyanobactéries et microalgues au et variation de la chlorophylle-a en fonction du temps.....	99
Figure 3.20 Evolution de l'effectif des populations de <i>Microcystis</i> au cours du temps.....	100
Figure 3.21 Evolution du pH en fonction de $\log(a\text{CO}_3^{2-})$ et $\log(a\text{Ca}^{2+})$ pour le site de Verneuil, du DIC en fonction de $\log(a\text{CO}_3^{2-})$ et Diagramme de solubilité dans l'espace $\log(a\text{PO}_4^{3-})$ en fonction du $\log(a\text{Ca}^{2+})$ pour le site Verneuil.....	102
Figure 3.22 Spectres d'absorption ATR-FTIR des échantillons de l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil) dans l'IR moyen.....	104
Figure 3.23 Analyse de la composition chimique élémentaire du particulaire de la Grosse Pierre (Verneuil). (A) Représentation dans les systèmes ternaires Ca-P-Si, ; Ca-P-S et ; K-P-S.	105
Figure 3.24 Analyses XANES de la matière en suspension de l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil).....	106
Figure 3.25 Analyses MEB représentatives de la diversité des phases riches en Ca l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil).....	108
Figure 3.26 Analyses MEB de <i>Microcystis</i> formant des granules iACC et PolyP dans l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil).....	109
Figure 4.1 Design expérimental de l'étude de l'expression génique de <i>Microcystis</i> (travaux de C. Pancrace).	126
Figure 4.2 Principal component analysis of the transcript abundances of 4440 <i>M. aeruginosa</i> genes during the day/night cycle.	134
Figure 4.3 Abundance profile of <i>ccyA</i> transcript during the day/night cycle.....	135
Figure 4.4 Differential abundance analysis of <i>ccyA</i> transcripts between sampling time t3_D (12 am, middle of the light period) and t8_N (7 am, end of the dark period).....	137
Figure 4.5 Schematic representation of the <i>ccyA</i> gene neighborhood in <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806SL complete genome assembly.	138
Figure 4.6 CDS with a <i>ccyA</i> -correlated transcript abundance profile during the day/night cycle.....	139
Figure 4.7 Abundance profiles of three genomic neighbors of <i>ccyA</i> during the day/night cycle.....	140

Liste tableaux

Tableau II.I. Nom et localisation des plans d'eaux étudiés

Tableau III.I. Résultats préliminaire du criblage de la présence d'iACC (MEB-EDXS) et de la présence et de l'expression du gène *ccyA* (qPCR et RT-qPCR) des souches isolées à Verneuil et Cergy.

Tableau III.II. Couples d'amorces utilisées dans le cadre de cette étude

Tableau III.III Report des données géochimiques de l'étang des Galets (Cergy) et de l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil).

Tableau III.IV Report des données géochimiques du compartiment particulaire (< 0,22 µm) des sites de l'étang des Galets (Cergy) et de la Grosse Pierre (Verneuil).

Tableau III.V. Assignements et position des pics des spectres obtenus pour le site de Cergy.

Tableau III.VI Valeurs de la contribution des différentes phases de référence dans l'ajustement des spectres XANES par combinaisons linéaires pour le site de Cergy

Tableau III.VII. Proportion de *Phacotus* en nombre d'individus par mL d'eau de lac observés en MEB pour les deux sites étudiés. Pour le site de Verneuil, les individus n'ont pas été dénombrés et nous donnons ici une indication qualitative sur leur présence/absence

Tableau III.VIII Observations d'au moins une cellule de *Microcystis* formant des iACC par MEB ou MET pour les deux sites étudiés.

Tableau III.IX Proportions de *Microcystis ccyA+* dans l'ensemble de la population de *Microcystis* (gène ARNr 16S) pour les deux sites étudiés.

Tableau III.X Valeurs de la contribution des différentes phases de référence dans l'ajustement des spectres par combinaison linéaires pour le site de Verneuil. Pour chaque date, l'ajustement représenté sur la figure 3.23B est surligné en gris.

Tableau IV.I Résumé des études sélectionnées pour les analyses bio-informatiques

Tableau IV.II. Transcript abundance comparison between *ccyA* and the whole transcriptome, for each time point.

Tableau IV.III. Pairwise comparisons of *ccyA* transcript abundance at different time points

Abréviations

ATR : Attenuated Total reflectance ou Réflectance totale atténuée

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AEE : Alkaline Earth Elements (Eléments alcalino-terreux)

ARN : Acide Désoxyribonucléique

CDS : Coding DNA Sequence ou séquence codante d'un gène

Chl-a : Chlorophylle-a

DIC : Dissolved Inorganic Carbon ou Carbone inorganique dissous

DO : Densité Optique

DOC : Dissolved Organic Carbon ou Carbone organique dissous

EDXS : Energie Dispersive de rayons X

EPS : Extracellular Polymeric Substances ou substances polymériques extracellulaires

EXAFS : Extended X-Ray Absorption Fine Structure

FTIR : Fourier-transform infrared spectroscopy ou spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

iACC : intracellular Amorphous Calcium Carbonates ou Carbonates de calcium intracellulaires amorphes

ICP-AES : Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy ou spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif

LCF : Linear Combination Fitting ou ajustement par combinaison linéaire

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MET : Microscopie Electronique en Transmission

PCC : Pasteur Culture collection of Cyanobacteria ou Collection de cyanobactéries de l'institut Pasteur

PCR : Polymerase Chain Reaction ou réaction en chaîne par polymérase

PMC : Paris Museum Collection ou Collection de Cyanobactéries du Muséum National d'Histoire Naturelle

q-PCR : quantitative PCR ou PCR quantitative

RT-qPCR : Reverse transcription polymerase chain reaction ou transcription inverse suivie d'une PCR

STEM : Scanning Transmission Electron Microscopy

XANES : X-ray Absorption Near Edge Structure

XAS : Spectrométrie d'Absorption des rayons X

Chapitre 1 : Contexte de l'étude

1 Importance et diversité de la biominéralisation

1.1 Définitions

La biominéralisation désigne la formation de structures minérales par le vivant (1). Il existe une grande diversité de biominéraux parmi lesquels pour n'en citer que quelques-uns, notre squelette, l'émail de nos dents, en passant par les coquilles des mollusques. Mais plus largement, les biominéraux sont présents dans les trois domaines du vivant (bactéries, archées et eucaryotes). Pour de nombreux biominéraux, notamment formés par les métazoaires, de nombreux rôles ont été identifiés dans la biologie des organismes qui les produisent : structure (squelette, coquilles), protection, (coquilles), nutrition (dents), etc. Mais certains autres biominéraux peuvent remplir des fonctions moins intuitives, comme la perception de la gravité (2) ou l'orientation selon le champ magnétique terrestre (3). Enfin, pour un certain nombre encore, la question même de s'ils ont une fonction se pose (4).

Parmi les différentes définitions d'un minéral proposées depuis les débuts de la cristallographie à la fin du XVIII^{ème} siècle (5), E. Nickel, en 1995 à la demande de l'International Mineralogical Association, propose que « en règle générale, un minéral est un corps chimique simple ou composé qui est normalement cristallin ». Un minéral présente donc une structure cristalline c'est-à-dire que les atomes ou les molécules qui composent ce corps chimique sont assemblés de manière ordonnée à grande échelle spatiale. Cependant, il existe des solides organisés sous forme amorphe (sans ordre à moyenne et grande distance) dont la classification en tant que minéraux est parfois débattue. Dans le cas des biominéraux, la définition englobe l'ensemble des composés, cristallins ou non, dont la précipitation est facilitée d'une façon ou d'une autre par le vivant. Les biominéraux ne sont pas forcément purement composés de phases inorganiques, mais sont parfois associés à des molécules organiques, qui peuvent permettre la précipitation ou encore moduler la morphologie des minéraux (6).

On distingue trois modes de biominéralisation :

Influencée : lorsque la nucléation et la croissance des minéraux est modifiée par la présence de molécules organiques extracellulaires, tel que les polysaccharides (7) (Figure 1.1a). Ces dernières agissent comme des sites de nucléation préférentiels et favorisent la nucléation hétérogène.

Induite : lorsque l'activité métabolique des micro-organismes induit ou accélère la précipitation (Figure 1.1b). Un exemple très documenté est la précipitation de carbonates de calcium induite par l'activité photosynthétique des cyanobactéries. Les cyanobactéries prélèvent du carbone inorganique (HCO_3^-) dans leur environnement, pour le convertir en CO_2 et OH^- au niveau de leur carboxysome (8). Le CO_2 est fixé par l'enzyme RuBisCo, tandis que l' OH^- est libéré dans le cytoplasme. Pour contrebalancer cet apport d' OH^- , les cellules importent des ions H^+ de leur environnement afin de maintenir leur pH intracellulaire proche de la neutralité. Ce phénomène provoque une augmentation extracellulaire locale du pH, ce

qui induit la précipitation de CaCO_3 (9). On retrouve des traces de ce phénomène dans des roches carbonatées sous forme de stromatolithes (Figure 1.2A). Ces roches sont parmi les plus anciennes traces de vie sur Terre (10).

Contrôlée : lorsque la formation des biominéraux implique un contrôle génétique spécifique à la biominéralisation. Celle-ci a lieu dans des compartiments ou des tissus dédiés (Figure 1.1C). Les organismes peuvent alors contrôler la saturation de la solution où les minéraux se forment via des mécanismes de transport cellulaire et produire des molécules organiques, facilitant ainsi la nucléation et la croissance des minéraux et pouvant même influencer leur morphologie. Par exemple, les coquilles des mollusques ou les tests des coccolithophores (Figure 1.2C) résultent d'un processus finement régulé (11,12). Cette régulation est souvent favorisée par le confinement de la formation des minéraux dans des vésicules organiques dédiées, ou dans des matrices organiques (13). Dans la plupart des cas, les biominéraux formés dans le domaine intracellulaire sont ensuite exportés à l'extérieur de la cellule pour servir de bloc de construction à des coquilles ou des squelettes, comme chez les coccolithophores (12).

1.2 La biominéralisation du CaCO_3

Il existe plus de 60 types de biominéraux (14). Parmi les plus abondants on retrouve des phases de phosphate de calcium (par exemple l'hydroxyapatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$), la silice (SiO_2) et des composés de carbonate de calcium (CaCO_3). Le CaCO_3 rentre dans la composition de nombreux tissus bio-minéralisés, des carapaces des crustacés (15) aux squelettes des coraux (16).

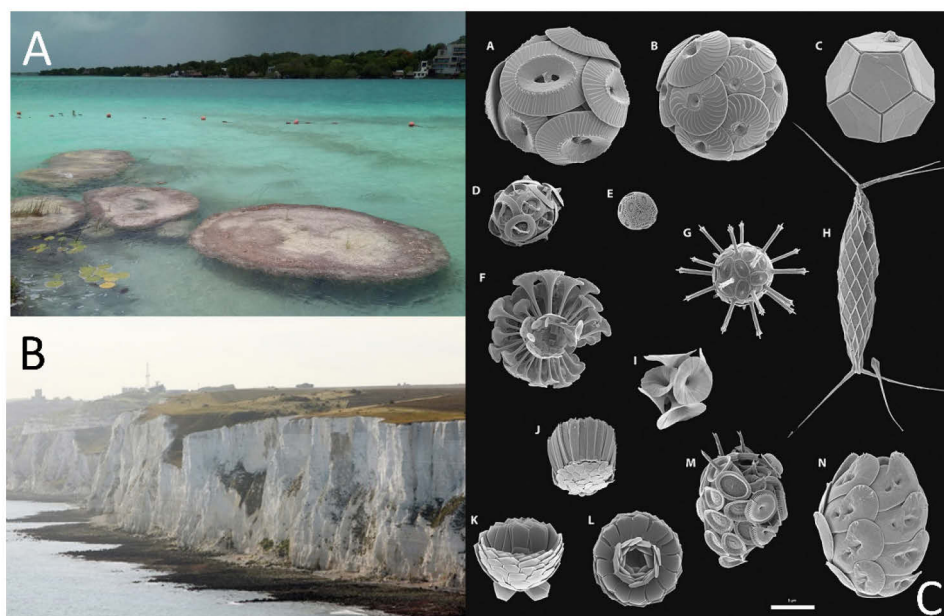


Figure 1.1 Diversité des biominéraux de CaCO_3 . (A) Stromatolithes actuels de l'étang de Bacalar (Mexique), formés par biominéralisation induite par l'activité photosynthétique de cyanobactéries. (B) Falaises composées de dépôts de calcaires formé par accumulation de squelettes de microalgues : les coccolithophores (Fan Bay, Dover Cliffs, © Alan Duncan) (C) Diversité des coccolithophores, les coccolites qui forment leur coquilles est un exemple de biominéralisation contrôlée (12).

La dissolution et la précipitation des carbonates biogéniques ont un impact significatif sur le cycle global du carbone (17). Le cycle géochimique d'un élément chimique est un modèle quantifiant l'abondance de cet élément dans différents réservoirs (c'est-à-dire des entités avec un fonctionnement géochimique propre, par exemple l'atmosphère, les océans, les sols) ainsi que les flux entre ces réservoirs. Dans ce cas, le calcium (Ca) et le carbone (C) piégés dans les biominéraux d'origine marine sont extraits du réservoir des eaux peu profondes où la photosynthèse se produit (au-dessus de 200 mètres de profondeur) et sont enfouis dans les sédiments (18). Par conséquent, les carbonates biominéralisés constituent un des plus grand réservoir de carbone de la surface de notre planète (19).

Il existe 6 phases de carbonate de calcium décrites à ce jour, dont trois polymorphes cristallins : la calcite et l'aragonite, polymorphes impliqués dans la composition de la majorité des biominéraux de CaCO_3 (13), et la vatérite, polymorphe moins stable et souvent transitoire (20). On peut également trouver du CaCO_3 sous la forme de deux polymorphes hydratés métastables (monohydrocalcite et ikaite) (21,22), et sous forme de carbonates de calcium amorphes (ACC). De par leur absence de structure cristalline, les ACC ont des propriétés physiques distinctes des formes cristallines, dont une solubilité plus grande (23). Cette solubilité plus importante les rend généralement moins stables que d'autres formes cristallines dans les mêmes conditions (24).

Il existe plusieurs voies de formation d'un minéral (25). L'une des voies qui facilite le passage d'ions en solution à un solide cristallisé est l'abaissement des barrières énergétiques d'activation de la nucléation et/ou de la croissance (26). Le passage par des précurseurs amorphes est une des étapes possibles dans ce processus. En cela, les ACC ont été caractérisés comme des phases transitoires dans de nombreux processus de carbonatation, d'origine biotique ou non (27,28). Chez les eucaryotes, les ACC ont été documentés comme précurseurs de minéraux de calcite ou d'aragonite dans de nombreux organismes : mollusques (28), oursins (27) ou encore ascidies (29). Le passage par une phase amorphe permet d'obtenir des morphologies atypiques des minéraux (30).

Mais les ACC ne sont pas uniquement présents en tant que phase transitoire dans le vivant. Des ACC stables ont été décrits dans de nombreux organismes eucaryotes, principalement certains crustacés (6). Ces ACC peuvent être stabilisés par des ions magnésium et/ou phosphates, des molécules organiques (31,32), ou encore l'effet du confinement (33), notamment dans des vésicules (34). Ces phases, stables *in vivo*, ne le restent pas forcément une fois extraites (6).

On trouve également du carbonate de calcium sous forme amorphe chez les bactéries, même si ce phénomène a été longtemps négligé (35,36). Il a été démontré qu'*Achromatium oxaliferum*, une bactérie géante largement répandue à la limite oxi-anoxique dans les sédiments d'eau douce, saumâtre et marine, forme de nombreuses inclusions intracellulaires d'ACC qui remplissent la plus grande partie du volume de la cellule (37,38). Ce n'est qu'en 2012 que la présence d'ACC a été mise en évidence chez une autre bactérie qu'*Achromatium*. Une cyanobactérie de l'ordre des Gloeobacterales,

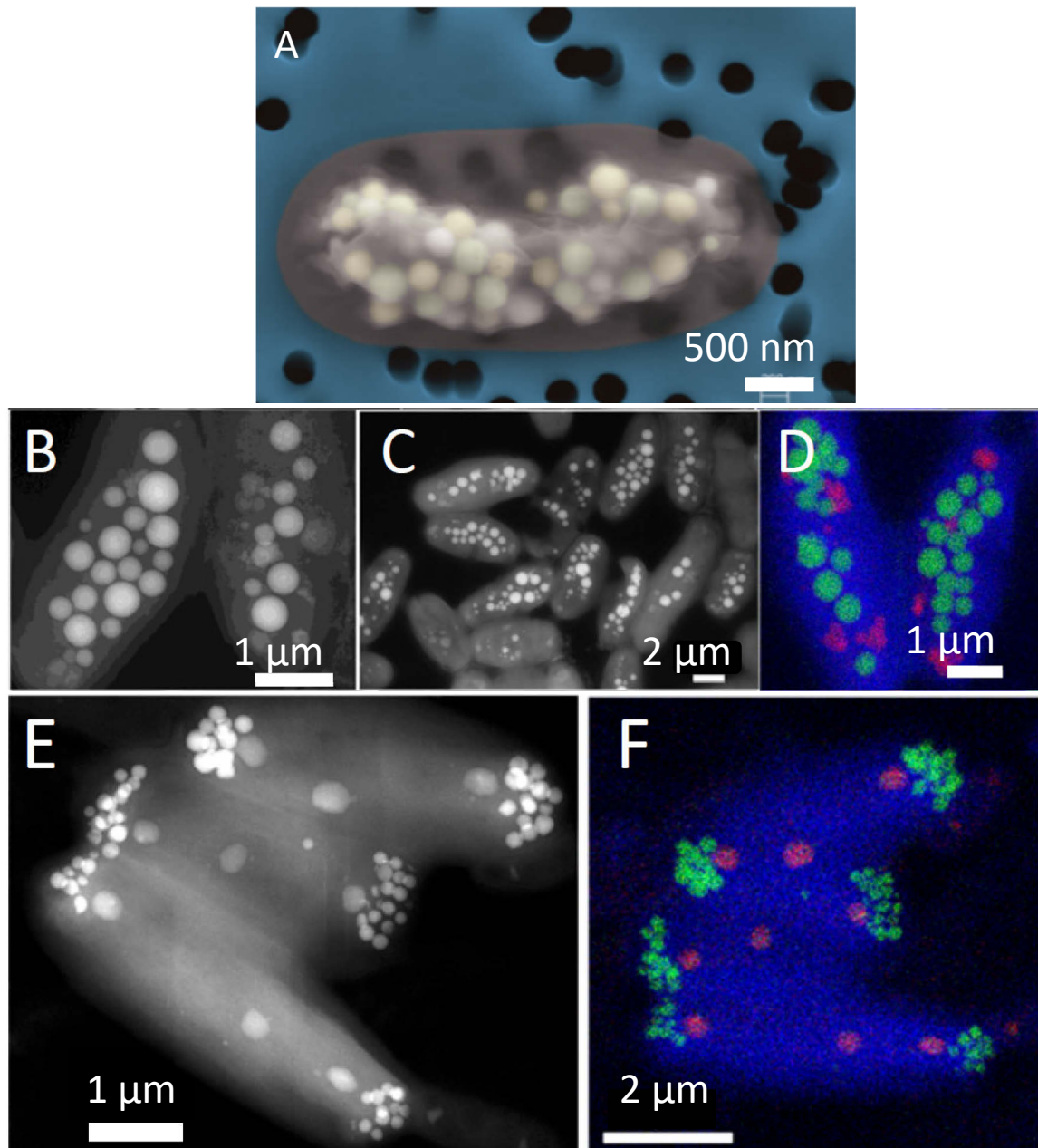


Figure 1.2 Exemple de biominéralisation de CaCO_3 intracellulaires amorphes. (A) Image de microscopie électronique à balayage en mode électronique secondaire d'une cellule de *Gloeomargarita lithophora* (fausses couleurs). La cellule est colorée en gris ; le filtre sur lequel elle est déposée est en bleu et les sphères brillantes dans les cellules sont les iACC. (B à D) Image en microscopie électronique de cyanobactéries formant des iACC dispersés dans la cellule. (B et C) *Chroococidiopsis thermalis* PCC 7203, image SEM en mode de détection AsB. (C) Cartographie STEM-EDX de PCC 7203. (E et F) Image en microscopie électronique de cyanobactéries formant des iACC répartis aux pôles dans la cellule. (E) Image STEM-HAADF et (F) Cartographie STEM-EDX de *Candidatus S. calcipolaris* G9 (lac Alchichica, Mexique). Figures et légendes adaptées de (A) Couradeau *et al.* 2012 (39), et (B à F) de Benzerara *et al.* 2014 (35). Code couleur cartographies STEM -EDX : calcium en vert, phosphore en rouge.

Gloeomargarita lithophora isolée d'un lac alcalin au Mexique, forme en effet des inclusions de carbonates de calcium contenant également du strontium (Sr) et du baryum (Ba), deux alcalino-terreux (AEE) comme le calcium (Figure 1.2A) (39,40). Depuis, une large variété d'organisme s'est avérée capable de former ces inclusions, dont des gammaprotéobactéries (37,41) et des alphaprotéobactéries, qui par ailleurs sont magnétotactiques (42). Il est

intéressant de noter que les bactéries magnétotactiques sont capables de biominéraliser des chaînes de magnétite (Fe_3O_4) ou de greigite ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{S}_4$) (43). Ces chaînes, contenues dans des vacuoles spécialisées, les magnétosomes, leurs permettent de s'orienter selon les lignes du champ magnétique terrestre (44). Ce cas reste le cas le mieux documenté de biominéralisation contrôlée chez les procaryotes à ce jour.

2 La biominéralisation d'iACC chez les cyanobactéries

2.1 Métabolisme des cyanobactéries

Les cyanobactéries sont un groupe monophylétique de bactéries (procaryotes) que l'on trouve dans la plupart des environnements à la surface de la Terre. Elles se caractérisent par leur capacité de photosynthèse oxygénique, semblable à celle des plantes, qui implique l'oxydation de l'eau et la production de dioxygène (O_2). En outre, elles utilisent le dioxyde de carbone comme source de carbone pour leur croissance, à quelques exceptions près.

La photosynthèse oxygénique (*i.e.* avec notamment l' O_2 comme produit final du métabolisme) est apparue avec les cyanobactéries il y a au moins 2,7 Ma (45,46). Première étape dans le basculement d'une atmosphère primaire presque dépourvue d' O_2 (47), à une atmosphère actuelle riche en O_2 , l'apparition des cyanobactéries a bouleversé l'histoire de la vie sur Terre (48,49). L'augmentation de l'oxygène atmosphérique a en effet probablement entraîné l'extinction de nombreux organismes anaérobies incapables de tolérer ou d'utiliser l'oxygène (50). Cependant, elle a également ouvert la voie au développement d'organismes aérobies capables d'exploiter l'oxygène pour produire de l'énergie, ce qui a conduit à la diversification des formes de vie. Un événement d'endosymbiose (*e.g.* symbiose où l'un des organismes est contenu dans l'autre) a permis le transfert du métabolisme photosynthétique aux eucaryotes, permettant l'émergence et l'évolution des algues et des plantes supérieures (51–53). Aujourd'hui les cyanobactéries sont parmi les organismes les plus importants sur Terre, avec une biomasse globale estimée à 3×10^{14} g de C de biomasse humide (54). Elles sont responsables de jusqu'à 25% de productivité primaire dans les océans, et ont à ce titre, une importance écologique significative (55,56).

L' O_2 et le CO_2 peuvent rentrer en compétition au niveau du site actif de l'enzyme clef de la photosynthèse, la Rubisco (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase). C'est un catalyseur relativement peu efficace, notamment en raison de sa faible affinité pour le CO_2 et sa faible spécificité pour le CO_2 par rapport à l' O_2 . Les cyanobactéries possèdent une adaptation environnementale particulière qui permet d'augmenter l'efficacité de cette enzyme : les mécanismes de concentration du CO_2 (CCM) (57). La Rubisco est encapsulée dans un micro-compartiment protéique, le carboxysome (58), dans lequel une concentration élevée de CO_2 est maintenue par un ensemble de transporteurs de carbone dédiés (voir Figure 1.4).

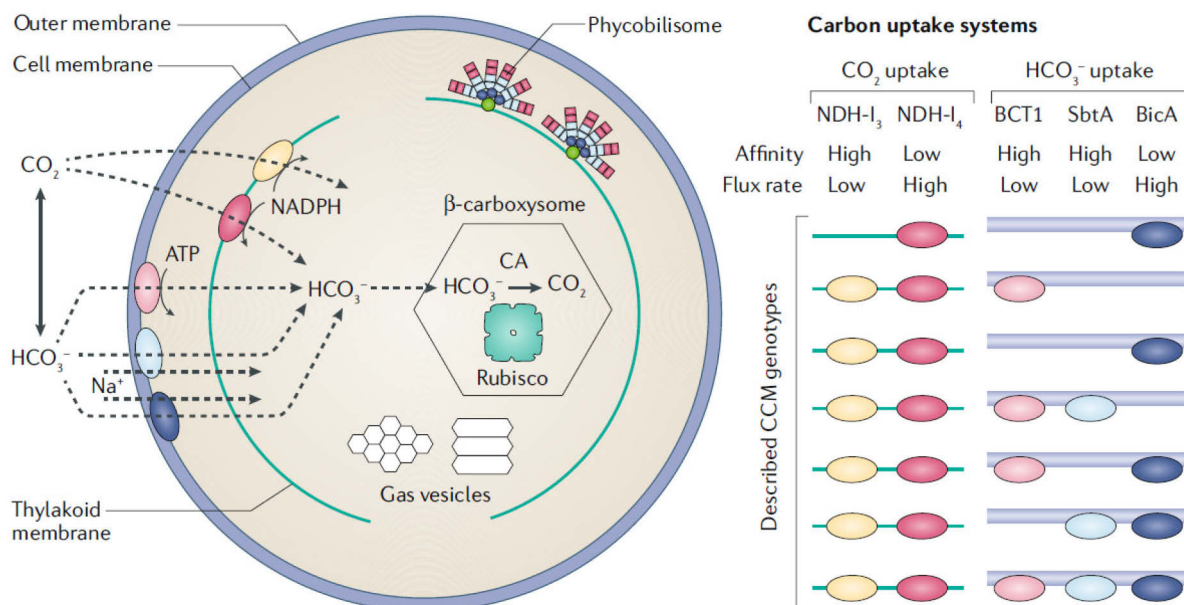


Figure 1.3 Mécanismes de concentration du CO₂ chez les cyanobactéries. Le mécanisme de concentration du CO₂ (CCM) des cyanobactéries comprend jusqu'à cinq systèmes d'absorption du carbone inorganique : deux pour le dioxyde de carbone (CO₂) (NDH- I₃ et NDH- I₄) et trois pour le bicarbonate (HCO₃⁻) (BCT1, SbtA et BicA). Ces systèmes d'absorption accumulent le carbone inorganique intracellulaire sous forme de bicarbonate, qui est transporté vers un micro-compartiment appelé carboxysome. Dans le carboxysome, l'anhydrase carbonique (AC) convertit le bicarbonate en CO₂, augmentant ainsi la concentration locale de CO₂ à des niveaux auxquels l'enzyme Rubisco, qui fixe le CO₂, peut fonctionner efficacement. Les cinq systèmes d'absorption du carbone diffèrent par leurs propriétés cinétiques. Les différentes souches combinent ces systèmes d'absorption de différentes manières, ce qui entraîne des variations entre les souches dans leur réponse à la disponibilité du CO₂ et du bicarbonate. La partie droite de la figure montre la variation génétique des systèmes d'absorption du carbone qui a été décrite jusqu'à présent chez les β- cyanobactéries. Figure et légende de Huisman *et al.* 2018 (114).

2.2 Distribution environnementale et phylogénétique des cyanobactéries formant des iACC

La formation d'iACC a été détectée dans des souches provenant d'environnements très différents : pour ne citer que quelques exemples, des sols en Allemagne, des champs de riz au Sénégal, ou encore des sources thermales au Japon et aux Etats-Unis (35,59). Cette découverte a bousculé le paradigme établi selon lequel la formation de carbonates par les cyanobactéries était uniquement induite et non contrôlée génétiquement. Les souches formants des iACC seront nommées iACC+ et celles n'en formant pas iACC- dans la suite de ce manuscrit.

En 2014, Benzerara *et al.* étudié 68 souches de cyanobactéries, et ont identifié parmi elles 8 souches phylogénétiquement différentes capables de former des iACC. La capacité de biominéralisation des iACC semble donc ne pas être une capacité rare parmi les cyanobactéries, et elle est répandue parmi l'arbre phylogénétique des cyanobactéries (35,60). La mise en évidence d'un gène marqueur de la biominéralisation (60) a permis d'augmenter encore le nombre des cyanobactéries connues possédant cette capacité à une vingtaine de souches, un chiffre ayant encore augmenté significativement depuis.

2.3 Importance quantitative du piégeage de Ca

La formation des iACC par les cyanobactéries semblent jouer un rôle important pour l'homéostasie du calcium chez ces souches. En 2019, De Wever *et al.* (61) ont comparé la croissance de 52 souches de cyanobactéries, dont 16 formant des iACC dans un milieu de culture synthétique (BG11) avec initialement soit 250 μM (milieu original) soit 50 μM de Ca (milieu modifié). Ils ont pu montrer que toutes les souches iACC+ prélevaient significativement plus de Ca dans le milieu que celles ne formant pas d'iACC, avec une variation pouvant aller à presque 100% de consommation du calcium en solution (Figure 1.4). De plus, ils ont montré que deux souches iACC+ sur trois, montraient une vitesse de croissance et une biomasse finale plus importante à 250 μM qu'à 50 μM de Ca. En formant des iACC, ces cyanobactéries semblent donc accumuler des quantités intracellulaires importante de calcium, comparée à d'autres bactéries.

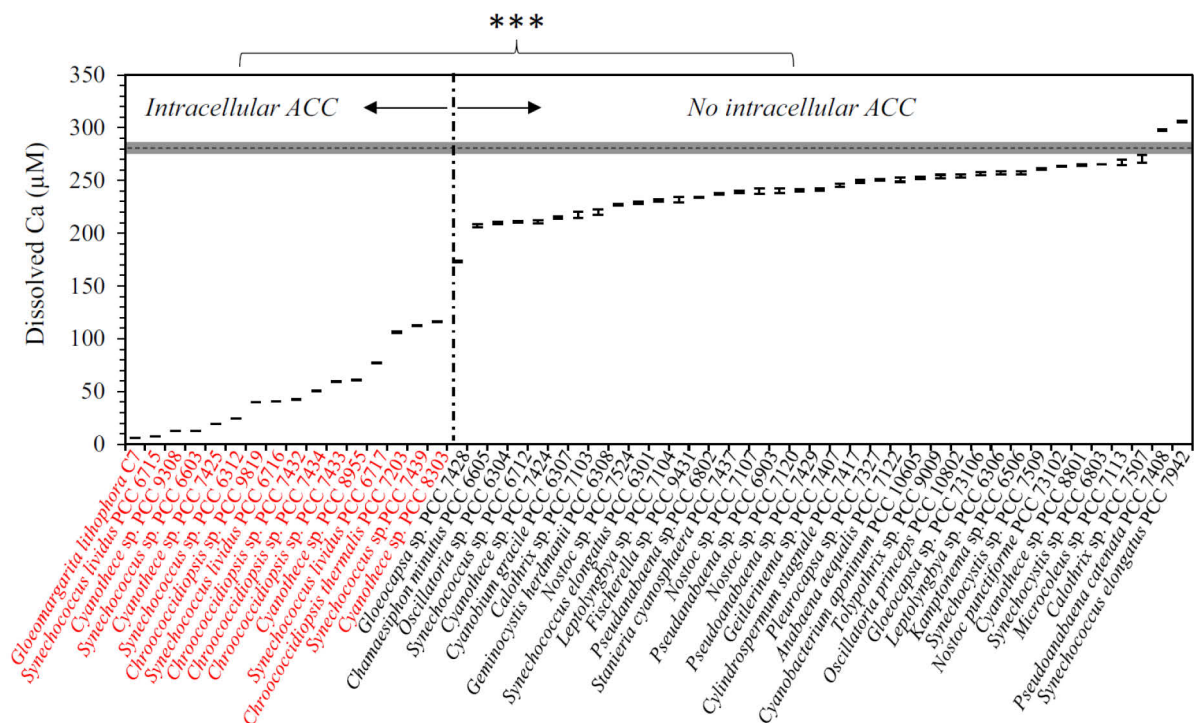


Figure 1.4 Représentation graphique des concentrations de calcium dissous restant après 40-61 jours d'incubation pour les 52 souches testées par De Wever *et al.* (61) En rouge : souches formant des carbonates de calcium intracellulaires (iACC+) ; en noir : souches ne formant pas de carbonates intracellulaires (iACC-). La ligne en pointillé représente la concentration initiale de calcium dissous dans le milieu de culture (BG-11). La zone grise correspond aux barres d'erreur autour de cette valeur. Les barres d'erreur ont été calculées sur la base de la précision de l'ICP-AES. Figure et légende de De Wever *et al.* 2019 (61).

Une étude par Ragon *et al.* 2014 (59) a montré la présence de cyanobactérie iACC + dans de nombreux tapis microbien, particulièrement des tapis de sources hydrothermales, avec certaines de ces cyanobactéries pouvant être relativement abondantes au moins localement. Par ailleurs, de nombreuses séquences d'ADNr 16S très proches de celles des cyanobactéries formant des iACC ont été identifiées dans des banques de données établies par metabarcoding par Bradley *et al.* (2017) (62), à partir d'échantillons de roches carbonatées formées par des micro-organismes. Ces séquences représentent jusqu'à 10% de la diversité bactérienne totale. Ceci suggère que dans cet environnement étudié ces

cyanobactéries sont abondantes. Ces observations soulignent l'importance de mieux comprendre la distribution et la fonction des cyanobactéries formant des iACC pour évaluer leur rôle écologique et leur impact sur les écosystèmes où elles se trouvent.

2.4 Mécanismes de formation des iACC chez les cyanobactéries

A ce jour, on connaît peu de choses sur les mécanismes moléculaires de la biominéralisation intracellulaire chez les cyanobactéries (7) ou son rôle (4). Néanmoins, un certain nombre d'éléments ont été notés que nous répertorions ci-dessous.

La précipitation intracellulaire de carbonate de calcium est un processus coûteux énergétiquement pour la cellule. Cam *et al.* (2018) (63) ont en effet montré la formation d'ACC par des cellules dans des milieux extracellulaires (milieu de culture) sous-saturés par rapport à l'ACC. Les mesures chimiques de pH, de concentration en calcium ($[Ca^{2+}]$) et en bicarbonate ($[HCO_3^-]$) réalisées sur certaines cyanobactéries, montrent que le cytoplasme semble également sous-saturé par rapport à l'ACC (63). Pour permettre la précipitation d'ACC, la solution doit être, au moins localement, sursaturée. Le maintien de cette sursaturation, qui peut impliquer une concentration active d'ions et/ou un contrôle du pH ainsi vraisemblablement qu'une compartimentalisation de l'iACC dans le cytoplasme semble être un processus actif, c'est-à-dire coûtant de l'énergie (54).

Une enveloppe de nature indéterminée, d'environ 2,5 nm d'épaisseur était systématiquement présente autour des granules d'ACC observée par CEMOVIS (*e.g.* une technique couplant découpe en cryo-ultramicrotomie et observations en cryo-microscopie électronique) par Blondeau *et al.* (2018) (64). Cette épaisseur d'enveloppe pourrait correspondre à une mono-couche lipidique, ou à une enveloppe protéique. Dans les deux cas, ce confinement des iACC dans un compartiment spécialisé contribue très probablement à la formation et la stabilisation des carbonates de calcium amorphes dans la cellule (55). Il a par ailleurs été proposé que la formation d'iACC chez *Achromatium* sp. et chez les bactéries magnétotactiques formant des iACC était également confinée à une vésicule, cette fois ci délimitée par une bicouche lipidique (65,66).

Il est intéressant de noter ici que la présence d'ion Sr, Ba et Mg dans les ACC formés par *Gloeomargarita lithophora* a été suggérée comme jouant un rôle dans la stabilisation des granules d'ACC chez cette souche (31,32,67). *Gloeomargarita lithophora* est cependant l'une des deux seules souches actuellement décrite comme accumulant préférentiellement le Ba puis le Sr au lieu du Ca (64,68) et les autres souches qui n'accumulent pas le Ba ou le Sr stabilisent tout autant l'ACC. Des études sur la composition et la structure des ACC formés par d'autres cyanobactéries permettraient de mieux comprendre la formation et la stabilisation de ces granules.

On distingue deux type de distribution des iACC dans les cellules : (i) les inclusions de carbonates de calcium sont dispersées dans le cytoplasme de la cellule, comme chez *G. lithophora*, (Figure 1.2A, E et F) et (ii) les inclusions de $CaCO_3$ sont réparties aux pôles des

cellules et au septum (Figure 1.2B, C et D). Dans le deuxième cas, il a été montré que la formation des iACC était concomitante avec la formation du septum de division. Ainsi, à la division de la cellule, les inclusions se retrouvent aux pôles des cellules-filles (35). Cette distribution spatiale est cantonnée à un clade particulier : celui de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. Li *et al.* (2016) (36) ont proposé un lien entre la formation de carbonates au septum avec la protéine FtsZ, une protéine ubiquitaire du cytosquelette qui, chez *E. coli*, nécessite la présence de concentrations en Ca^{2+} de l'ordre du millimolaire pour son assemblage (70). La cellule pourrait répondre à cette contrainte par des influx localisés élevés de Ca près du septum pendant la division cellulaire. Dans le clade de *T. elongatus* BP-1, on peut imaginer que cette augmentation locale de Ca pourrait favoriser la formation d'iACC. Il serait donc intéressant d'étudier s'il existe une corrélation entre la capacité de certaines cyanobactéries à former des carbonates intracellulaires et la concentration de Ca nécessaire à la polymérisation de leur protéine FtsZ. Il existe donc probablement un lien entre biominéralisation et division cellulaire comme ce qui a été observé pour la formation des magnétites chez les bactéries magnétotactiques (71).

2.5 Contrôles moléculaires de la formation d'iACC chez les cyanobactéries : le gène *ccyA*

Plusieurs étapes de la synthèse des iACC pourraient être contrôlées : 1) les étapes initiales de la nucléation, 2) la croissance de l'iACC et 3) la régulation des échanges d'alcalino-terreux et de carbonate entre la cellule et la solution extracellulaire. Par conséquent, des protéines ou d'autres molécules jouant divers rôles de transport, de contrôle ou de régulation pourraient être impliquées dans ce processus. Par une approche de génomique comparative sur un ensemble de 56 souches de cyanobactéries diverses phylogénétiquement, l'équipe du laboratoire d'accueil (IMPMC) a pu identifier un gène orphelin (*i.e.* distant en séquence de tout autre gène de fonction connue présent dans les banques de données) dont la présence est corrélée avec la formation d'iACC : le gène *ccyA* (60).

Le produit du gène *ccyA*, la calcyanine, est une protéine composée de deux domaines. Le domaine C-terminal consiste en une triplication d'un motif riche en glycine, similaire aux motifs glycine zipper (GlyZip). Le domaine N-terminal est lui parfois composé de clusters hydrophobes, avec une structure typique d'un domaine globulaire (72). Bien que le domaine C-terminal soit très conservé dans toutes les séquences connues de la protéine, le domaine N-terminal est variable et peut être classé en quatre groupes dénommés CoBaHMA, X, Y et Z. Le domaine le plus répandu, de type CoBaHMA, présente une homologie avec la famille des domaines HMA (Heavy Metal Associated), présents dans une grande variété de protéines et généralement impliqués dans le transport de métal et les voies de détoxifications (73) mais avec une spécificité de structure et de séquence. La distribution et la phylogénie du gène suggèrent que la biominéralisation de l'iACC est ancienne, avec des pertes indépendantes dans différentes lignées plutôt que des transferts horizontaux (60).

A ce jour, la fonction exacte du gène reste inconnue. Cependant, un faisceau d'indices semble suggérer que la protéine codée par ce gène, la calcyanine, joue un rôle dans l'homéostasie du calcium. En premier lieu, pour certaines cyanobactéries, *Chlorogloeopsis. Fritschii* PCC 9212 et PCC 6912, et *Fischerella* sp. NIES-4106, le gène *ccyA* est localisé à côté d'un transporteur $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$. Pour les souches *C. fritschii* PCC 9212 et PCC 6912, un transporteur de bicarbonate dépendant du Na^+ (BicA) est également localisé à proximité directe du gène *ccyA*. En cherchant des homologues de ces gènes dans 602 génomes cyanobactériens, Benzerara *et al.* (2022) (60) ont montré que les 35 génomes possédant *ccyA* possédaient également au moins une copie de chaque gène. La présence de ces deux gènes est significativement associée avec celle de *ccyA* dans leur jeu de données. Benzerara *et al.* (2022) (60) ont également induit la surexpression de deux versions du gène *ccyA* dans une cyanobactérie ne possédant pas le gène *ccyA*, *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Ces gènes provenaient de deux bactéries distantes phylogénétiquement : *Synechococcus* sp. PCC 6312 (callyanine de type W) et *G. lithophora* (callyanine de type X). Ils ont montré une accumulation de calcium plus importante dans les polyphosphates (polymères d'orthophosphates fréquemment trouvé dans les cellules bactériennes (74)) chez les souches transformées avec les plasmides contenant *ccyA* que chez celles contenant le plasmide vide.

2.6 Rôle putatif des iACC

On sait encore très peu de choses sur la formation des iACC, et leur rôle reste également inconnu, mais quelques hypothèses ont été avancées (4,39,68) :

- (1) Les cyanobactéries sont des organismes fixateurs de carbone (*i.e.* métabolisme autotrophes, ici via la photosynthèse). Des mécanismes existent pour concentrer le CO_2 dans des compartiments particuliers pour augmenter l'efficacité de la photosynthèse (carboxysome). Les iACC pourraient servir de stockage de par leur grande réactivité, liée à leur structure amorphe, qui pourrait permettre de remobiliser rapidement le carbone stocké.
- (2) Les cyanobactéries doivent réguler leur pH intracellulaire des fluctuations liées à la libération d' OH^- par la photosynthèse. Pour contrebalancer cet apport d' OH^- , les cellules ont des mécanismes d'importation de protons (7). La formation d'iACC, en libérant des ions H^+ , pourrait participer à cette régulation cellulaire.
- (3) Les iACC denses ($>2 \text{ g.cm}^{-3}$) pourraient avoir un rôle de lest similaire aux granules de glycogène et jouer un rôle dans la régulation de la flottabilité (4,75).

3 La biominéralisation d'iACC chez une cyanobactérie formant des efflorescences

En testant la présence du gène *ccyA* dans les génomes de cyanobactéries disponibles dans les banques de données publiques, et sachant que ce gène est un marqueur moléculaire des cyanobactéries capables de former des iACC, Benzerara *et al.* (2022) (60) ont identifié

12 souches du genre *Microcystis* comme positives, tandis que d'autres souches du même genre ne possèdent pas *ccyA*. Dix de ces souches se sont avérées capable de former des iACC (Figure 1.5). Il semble donc y avoir une diversité génotypique et phénotypique vis-à-vis de ce processus de biominéralisation chez ce genre : certaines souches possèdent *ccyA*, d'autres non ; la plupart des souches possédant *ccyA* forment des iACC mais quelques-unes non.

3.1 *Microcystis*, un genre de cyanobactéries particulièrement étudié

Microcystis est une cyanobactérie unicellulaire planctonique, rencontrée principalement dans des milieux d'eau douce (76,77) (Figure 1.6A et B). Ce genre est classé parmi les Bacteria; Eubacteria ; Cyanobacteria ; Cyanophyceae ; Chroococcales ; Microcystaceae. Les tailles des cellules, rondes, peuvent varier entre 1 et 9 μm de diamètre (Figure 1.6C). *Microcystis* se présente généralement sous la forme de colonies relativement

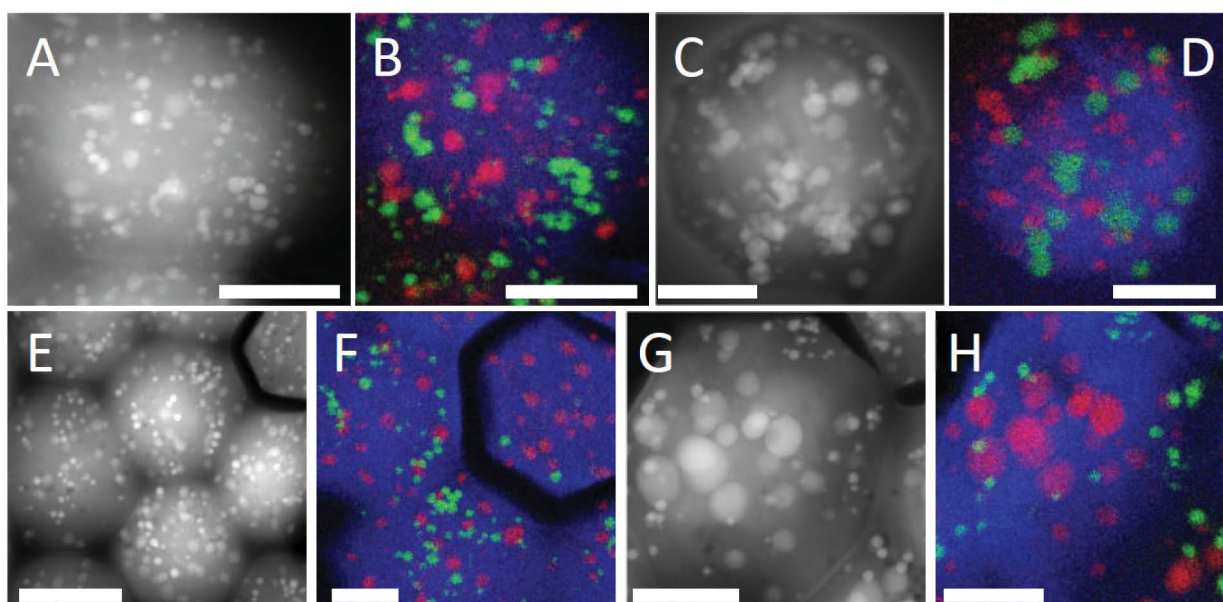


Figure 1.5 Biominéralisation d'iACC chez *Microcystis*. Images STEM-HAADF de 4 souches de *Microcystis* formant des iACC nouvellement identifiées (sur les 10 identifiées par Benzerara *et al.*) et superposition des cartes chimiques de C (bleu), Ca (vert) et P (rouge) obtenues par EDXS. L'échelle est de 2 μm . (A et B) *M. aeruginosa* PCC 7941; (C et D) *M. aeruginosa* PCC 9443 ; (E et F) *M. aeruginosa* PCC 9806 ; (G et H) *M. aeruginosa* PCC 9807. Figure et légendes adaptées de Benzerara *et al.* 2022 (60).

larges (>100 μm), entourées par un mucilage, composé de polymères extracellulaires (EPS) (78,79) (Figure 1.6E). Ce mucilage héberge un microbiome diversifié de bactéries qui peuvent y trouver une protection contre la prédation et l'infection par les phages (80). De plus, ces colonies constituent un lieu privilégié d'échange de molécules tels que du carbone organique, des nutriments, des facteurs de croissance (*i.e.* vitamine B₁₂), de l'O₂ et du CO₂ (81–85). Le microbiome du mucilage peut également contribuer à la décomposition de la matière organique (77) et d'élimination des métaux toxiques (86).

Microcystis est un genre connu pour sa capacité à produire des toxines, notamment la microcystine (87), mais également d'autres sortes de toxines, tel que l'anatoxine-a (88) ou des PSP (paralytic shellfish poison) (89), dans une moindre mesure. La microcystine peut provoquer des lésions sur le foie ainsi que des dommages du systèmes nerveux (90–92), et est la cause de nombreux empoisonnements humains ou animaux. Les efflorescences représentent donc un risque sanitaire dans les plans d'eau utilisés pour les sources d'eau potable ou les activités de loisir (93,94). Toutes les souches de *Microcystis* ne sont pas capables de synthétiser la microcystine. Les souches toxigènes possèdent un cluster de gènes organisés en opérons, les gènes *mcy*, leur permettant de synthétiser ces peptides (95–97).

3.2 Diversité intra-genre

Il existe aujourd'hui 19 noms d'espèces au sein du genre *Microcystis*, parmi lesquelles *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae*, *M. ichthyoblabe*, *M. natans*, *M. novacekii*, *M. panniformis*, *M. smithii*, *M. viridis*, et *M. wesenbergii* (98,99). Ces espèces sont décrites sur une base

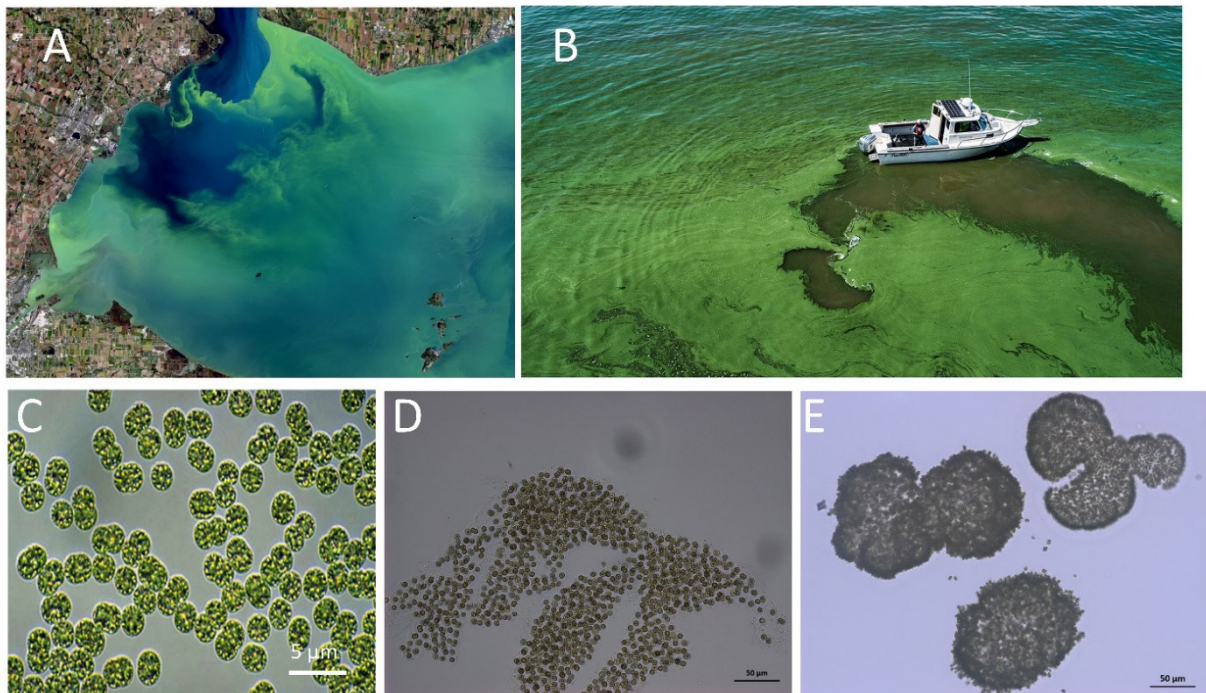


Figure 1.6 Efflorescences à *Microcystis*. (A) Photo satellite du lac Erie (Etats-Unis) soumis à une efflorescence à *Microcystis* (Observatoire de la Terre de la NASA, domaine public). (B) Photo de la rivière Maimee (Ohio, Etats-Unis) soumis à une efflorescence à *Microcystis* (© David J.Ruck). (C) Photos en microscopie optique de cellules de *Microcystis* (© EPIDOR). (D-E) photos de colonies de *Microcystis* en microscopie optique prélevées dans des lacs d'Ile de France

morphologique : on parle de morpho-espèces. Il est cependant reconnu que la distinction d'espèces sur la morphologie seule n'est pas exacte, puisqu'une seule souche peut prendre plusieurs morphologies (100). L'avancée des outils de génétiques a permis de s'affranchir des seuls critères morphologiques pour la description d'espèces.

Une définition génomique couramment utilisée des espèces est un groupe monophylétique partageant >94%-95% d'ANI (101,102). L'ANI (Average Nucleotide Identity) est une comparaison des régions codantes (*i.e.* gènes traduits en protéines) à l'échelle du nucléotide. Une comparaison récente de l'ensemble des génomes disponibles de *Microcystis* sp. (159 génomes) par Dick *et al.* (2019) a montré qu'ils présentent tous une ANI >93,6 % sur les parties partagées de leurs génomes avec tous les autres génomes de *Microcystis*, avec 99,8 % des comparaisons >94 % d'ANI et 70 % des comparaisons >95 % d'ANI. Si ce seuil de > 94-95% est discuté pour délimiter des espèces bactériennes (103–105), selon cette définition, la plupart des souches séquencées disponibles appartiendraient à une seule et même espèce. Le rassemblement de plusieurs morpho-espèces sous un même nom avait déjà été proposé à plusieurs reprises (106–108). C'est sur la base de ces considérations qu'il a été proposé l'utilisation du terme écotype plutôt que d'espèce pour ce genre. Un écotype est un groupement d'organismes qui interagissent avec des écotypes de la même espèce mais avec un flux de gènes limités par des barrières écologiques entre chaque écotype (109). La séparation géographique, les facteurs environnementaux (disponibilité des nutriments, l'intensité lumineuse et la température) et les limites de la dispersion peuvent conduire à la différenciation de populations de *Microcystis*, ce qui se traduit par des profils génomiques distincts, qui pourraient être apparentés à des écotypes (99,110,111). Dans ce manuscrit, nous utiliserons uniquement le terme *Microcystis* pour parler du genre dans son ensemble.

Ce genre possède donc une grande plasticité génomique : son génome contient de nombreux éléments transposables et de séquences répétées, et on observe une fréquence élevée d'évènements de transferts horizontaux de gènes (HGT) (112). On observe donc une synténie (*i.e.* ordination similaire des gènes dans le génome) faible entre les souches, ce qui pourrait amener à des schémas différents de régulation entre les souches. Enfin, le pangénome (*i.e.* gamme complète de gènes dans une espèce) de *Microcystis* a été montré comme assez grand et non complètement caractérisé (*e.g.* pangénome dit « ouvert ») (99,110,111,113). Cette plasticité lui permet une adaptation rapide à de nombreuses niches écologiques, et participe au succès écologique de ce genre (98,99).

3.3 Efflorescences formées par *Microcystis*

Microcystis est l'un des genres les plus fréquemment impliqués dans des efflorescences cyanobactériennes (98,114) (Figure 1.6A et B). Il n'existe pas de définition ou de quantification internationale précise de ce qu'est une efflorescence cyanobactérienne, mais ce phénomène est généralement considéré comme une prolifération importante d'organisme photosynthétique sur une courte période de temps, associé à une diminution de la diversité du phytoplancton. Ces efflorescences peuvent être visibles à l'œil nu, se présentant sous la forme de tapis ou de couches de biomasse cyanobactérienne à la surface de l'eau.

Cette prolifération soudaine est liée à des conditions environnementales favorables, telles qu'une disponibilité élevée en nutriments (*i.e.* phénomène d'eutrophisation) et une température appropriée (114,115). La croissance rapide des cyanobactéries lors d'une

efflorescence peut entraîner une dominance de la communauté phytoplanctonique par ces organismes. Cela peut avoir des conséquences écologiques, notamment en perturbant l'équilibre trophique et en réduisant la disponibilité de lumière, d'oxygène et de nutriments pour d'autres organismes aquatiques. Ainsi, on observe une diminution de la diversité d'autres espèces de phytoplancton. De plus, lors de la senescence des efflorescences, les cellules cyanobactériennes sont dégradées par des bactéries hétérotrophes qui consomment de l'oxygène. Cette consommation soudaine et parfois importante d'oxygène peut induire une hypoxie totale du milieu, causant de nombreux dégâts sur toute la chaîne alimentaire (116).

4 Déterminisme des blooms et écologie de *Microcystis*

4.1 Température

Microcystis, comme d'autres cyanobactéries, montre une croissance maximale à des températures plus élevées que d'autres genre du phytoplancton (*i.e.* l'ensemble des micro-organismes photosynthétiques dans la colonne d'eau) comme les diatomées ou les algues vertes (117). Cette caractéristique explique en partie le lien entre augmentation de la fréquence et de l'importance des efflorescences au niveau mondial, et réchauffement climatique (115,118,119). Les blooms de *Microcystis* se produisent habituellement au-dessus de 20 °C, et les optimums de croissance se situent entre 25 et 35°C selon les souches (99).

4.2 Flottabilité et stratification des lacs

Microcystis est capable de se déplacer verticalement dans la colonne d'eau via un système de vésicule à gaz et de ballast sous forme de réserves de glycogène et autres hydrates de carbone (120). C'est principalement l'accumulation ou la consommation des réserves carbonées qui impacte l'équilibre entre vésicule et glycogène, et donc la densité de la cellule (121). Cette accumulation est directement liée à l'activité photosynthétique : le glycogène s'accumule dans le cytoplasme lorsque l'activité photosynthétique dépasse l'activité respiratoire.

Ainsi, la flottabilité des cellules de *Microcystis* est directement impactée par la quantité de lumière reçue (120,122), ainsi que la température du milieu (123). Lorsque les cellules sont exposées à une forte lumière, l'accumulation de carbohydrate lié à la photosynthèse densifie les cellules, qui se déplacent vers les couches inférieures moins éclairées de la colonne d'eau. Lorsque l'activité photosynthétique diminue, la dégradation des réserves carbonées liée au métabolisme de la cellule (*e.g.* respiration et synthèse de protéine) entraîne une diminution de la densité des cellules, qui remontent alors vers la surface. La température semble également jouer un rôle sur la flottabilité, avec une diminution de la flottabilité concomitante avec la diminution de la température (123,124). Le rôle putatif des inclusions d'ACC dans la flottabilité des cellules pourrait contribuer à cette migration verticale.

Les cellules de *Microcystis* régulent leur flottabilité à l'échelle de la journée (125,126), en se maintenant à la surface pour optimiser la production photosynthétique pendant la journée, et en accédant à des zones plus riches en nutriments le soir (127). Cette stratégie est particulièrement efficace lorsque les lacs sont stratifiés pendant les périodes estivales, avec des eaux profondes riches en nutriments et de l'eau de surface ensoleillée mais pauvre en nutriments (98).

Microcystis montre également un cycle annuel. Les cellules de *Microcystis* sont en effet capables d'entrer dans un état de dormance physiologique dans la couche sédimentaire pendant l'hiver (128–131), et migrent de nouveau dans la colonne d'eau pendant l'été (132–134). Les conditions qui régissent ce cycle annuel sont encore mal comprises, mais cela semble jouer un rôle crucial dans la formation des efflorescences (135). Les mécanismes de survie des cellules dans l'environnement benthique sont également mal compris. En effet, les cellules de *Microcystis* semblent capables de s'accumuler à la surface des sédiments (136,137) et peuvent y survivre jusqu'à plusieurs années (134,138).

4.3 Importance du phosphore et de l'azote dans la dynamique des populations de *Microcystis*

Le phosphore est utilisé dans divers processus biologiques, tels que la synthèse d'ADN, d'ARN et de phospholipides, ainsi que pour la régulation des voies métaboliques. Le phosphate inorganique est plus biodisponible que les sources de P organiques. *Microcystis* utilise donc préférentiellement les phosphates inorganiques, tels que l'orthophosphate, provenant des apports externes tels que les eaux de ruissellement et les sédiments (139,140). *Microcystis* possède des mécanismes de transport spécifiques permettant l'absorption directe de cette source de P (141). L'utilisation de phospholipides et d'autres composés organiques, requiert une conversation préalable en orthophosphates par la cellule et une dépense énergétique supplémentaire (139,142). Ainsi, la concentration et la spéciation du P dans les environnements jouent un rôle majeur dans le déterminisme des blooms (143–145). *Microcystis* est capable d'importer du P dans des conditions très pauvres en P via l'expression de transporteurs de haute affinité (146,147). De plus, elles sont capables de stocker du P de façon intracellulaire, lors des périodes de privation, sous forme de polyphosphates (PolyP).

Concernant l'azote, *Microcystis* ne fixe pas l'azote atmosphérique (N_2) comme certaines cyanobactéries impliquées dans des efflorescences (148). Sa croissance et sa prolifération repose donc uniquement sur des sources externes d'azote. Plusieurs études ont montré que *Microcystis* préfère des formes réduites d'azote (comme l'ammonium (NH_4^+)) aux formes oxydées (nitrate (NO_3^{2-}) ou nitrite (NO_2^-)) (149–151). *Microcystis* est également capable d'utiliser l'urée, une forme d'azote présente en grande proportion dans les pollutions d'origine anthropique (95).

4.4 Dynamique des blooms

Lors des blooms, différentes populations de *Microcystis* peuvent se succéder ou co-exister. Comme évoqué précédemment, il existe une grande plasticité génomique au sein du genre *Microcystis* avec une grande diversité génotypique et phénotypique. La concentration en microcystine lors des efflorescences est directement liée à l'abondance relative entre les souches toxigènes et non toxigènes (152–156). C'est pourquoi la majeure partie du travail de recherche sur la dynamique de sous-populations de *Microcystis* se concentre principalement sur la présence ou l'absence de la capacité génétique à produire la toxine (e.g. présence/absence du cluster *mcy*). La dynamique des populations toxigènes et non toxigènes au sein des efflorescences semble être influencée par la concentration en azote et en phosphore (146,157), l'intensité lumineuse (158,159), le carbone inorganique, l'interactions avec les brouteurs, à la flottabilité et à la migration verticale, ou à une combinaison de ces facteurs (99). Comme évoqué par Dick *et al.* (2022), la capacité à produire des toxines n'est qu'une caractéristique parmi d'autres chez *Microcystis*. La capacité récemment découverte de biominéralisation de carbonate de calcium chez *Microcystis* pourrait être une caractéristique à explorer en termes de dynamique de population.

5 Problématiques et objectifs de la thèse

La découverte récente de la capacité à former des carbonates de calcium intracellulaires chez *Microcystis* soulève de nombreuses questions. Les premières observations de formation d'iACC chez *Microcystis* ont été réalisées sur quelques souches en culture. Une première question qui se pose est donc de savoir si *Microcystis* est capable de former des iACC dans des conditions environnementales. Nous avons vu précédemment que certaines souches de *Microcystis* forment des iACC, quand d'autres semblent en être incapables. Est-ce que des cellules iACC+ et iACC- co-existent dans une même population ? Au sein d'une même efflorescence ? On peut s'interroger sur la distribution de cette capacité à former les iACC chez ce genre : est-ce que la formation d'iACC est un trait répandu dans les populations de *Microcystis* à travers le monde, ou est-ce, au contraire, un trait peu distribué et limité à quelques niches écologiques particulières ? A l'image des études qui explorent la diversité génétique au sein du genre sur la base des génomes disponibles (99,113,160), nous explorerons les génomes disponibles pour évaluer la distribution de ce trait dans le genre complet. Ces questions ont fait l'objet de travaux publiés dans la revue *Environmental Microbiology* en 2022, et seront présentés dans le **chapitre 1**.

Les cellules de *Microcystis* peuvent être dominantes périodiquement dans certains plans d'eau. Si cette biomasse est couplée à une production importante d'iACC, cela amène à la notion de réservoir géochimique : cette réserve de Ca et de C que constitue les ACC biominéralisés par *Microcystis* pourrait être non négligeable par rapport au Ca et C en solution. De plus, on peut imaginer qu'une production importante d'iACC liée à des événements ponctuels comme les efflorescences peut modifier la dynamiques des flux géochimiques dans les environnements. Au sein d'une même population, plusieurs écotypes

peuvent co-exister, et les changements de conditions environnementales influent sur la dynamique temporelle des sous-population. Qu'en est-il de la capacité à former des carbonates de calcium amorphes ? Si des cellules iACC+ et iACC- co-existent dans une même population, existe-t-il une dynamique temporelle de ses populations, qui pourrait-être liée à des paramètres environnementaux ? Pour répondre à ces questions, une étude intégrative de deux plans d'eau a été réalisée en couplant des approches d'écologie microbienne, biologie moléculaire, minéralogie et de géochimie. Cette étude fera l'objet du **chapitre 2**.

La présence du gène *ccyA* est fortement corrélé à la formation d'iACC, ce qui en fait un marqueur du processus de biominéralisation. S'il semble impliqué dans l'homéostasie du calcium (60), son rôle exact reste encore à déterminer. La question se pose de savoir si le gène marqueur est exprimé ou non dans les souches formant des iACC dans les conditions de culture utilisées. Si oui, varie-t-elle selon un pattern jour/nuit ? Et enfin, peut-on identifier d'autres partenaires génétiques de *ccyA* ? 'étude de l'expression de l'une des souches, PCC 7806 (*ccyA* + et iACC +), a fait l'objet d'une publication en cours de préparation, qui sera incluse dans ce manuscrit. Les gènes voisins dans des génomes de cyanobactéries iACC+ et *ccyA*+ pourraient avoir un lien avec la biominéralisation d'iACC. Qu'en est-il du voisinage génomique chez cette souche ? Sont-ils exprimés de manière corrélée ? Les résultats de cette étude seront présentés dans le **chapitre 3**.

6 Bibliographie du Chapitre 1

1. Lowenstam HA. Minerals Formed by Organisms. *Science*. 1981 13;211(4487):1126–31.
2. Perbal G. L'action des statolithes dans la réponse géotropique des racines de *Lens culinaris*. *Planta*. 1974;116(2):153–71.
3. Blakemore RP. Magnetotactic Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 1982;(36):217–38.
4. Cosmidis J, Benzerara K. Why do microbes make minerals? *Comptes Rendus Géoscience*. 2022;354(G1):1–39.
5. Bouillard JC. Les minéraux, sciences et collections. CNRS Editions. Paris; 2016.
6. Addadi L, Raz S, Weiner S. Taking Advantage of Disorder: Amorphous Calcium Carbonate and Its Roles in Biomineralization. *Advanced Materials*. 2003;15(12):959–70.
7. Görgen S, Benzerara K, Skouri-Panet F, Gugger M, Chauvat F, Cassier-Chauvat C. The diversity of molecular mechanisms of carbonate biomineralization by bacteria. *Discov Mater*. 2021 Dec;1(1):2.
8. Price GD, Maeda S ichi, Omata T, Badger MR. Modes of active inorganic carbon uptake in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942. *Functional Plant Biol*. 2002;29(3):131–49.
9. Merz MUE. The biology of carbonate precipitation by cyanobacteria. *Facies*. 1992 1;26(1):81–101.
10. Nutman AP, Bennett VC, Friend CRL, Kranendonk MJV, Chivas AR. Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures. *Nature*. 2016;537(7621):535–8.
11. Falini G, Albeck S, Weiner S, Addadi L. Control of Aragonite or Calcite Polymorphism by Mollusk Shell Macromolecules. *Science*. 1996;5;271(5245):67–9.
12. Brownlee C, Wheeler GL, Taylor AR. Coccolithophore biomineralization: New questions, new answers. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2015;46:11–6.
13. Lowenstam HA, Weiner S. *On Biomineralization*. Oxford University Press; 1989. 335 p.
14. Weiner S, Lowenstam H. Organization of Extracellularly Mineralized Tissues: A Comparative Study of Biological Crystal Growth. *Critical Reviews in Biochemistry*. 1986 20(4):365–408.
15. Marin F, Luquet G. Molluscan shell proteins. *Comptes Rendus Palevol*. 2004 1;3(6):469–92.
16. Tambutté S, Holcomb M, Ferrier-Pagès C, Reynaud S, Tambutté É, Zoccola D, et al. Coral biomineralization: From the gene to the environment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2011 15;408(1):58–78.
17. Falkowski P, Scholes RJ, Boyle E, Canadell J, Canfield D, Elser J, et al. The Global Carbon Cycle: A Test of Our Knowledge of Earth as a System. *Science*. 2000 13;290(5490):291–6.
18. Van Cappellen P. Biomineralization and Global Biogeochemical Cycles. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. 2003 3;54(1):357–81.
19. Bramlette MN. Significance of coccolithophorids in calcium-carbonate deposition. *GSA Bulletin*. 1958 1;69(1):121–6.
20. Lowenstam HA, Abbott DP. Vaterite: A Mineralization Product of the Hard Tissues of a Marine Organism (Asciacea). *Science*. 1975 25;188(4186):363–5.
21. Hull H, Turnbull AG. A thermochemical study of monohydrocalcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1973 1;37(3):685–94.
22. Marland G. The stability of $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ikaite). *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1975 1;39(1):83–91.
23. Kellermeier M, Picker A, Kempter A, Cölfen H, Gebauer D. A Straightforward Treatment of Activity in Aqueous CaCO_3 Solutions and the Consequences for Nucleation Theory. *Advanced Materials*. 2014;26(5):752–7.
24. Radha AV, Fernandez-Martinez A, Hu Y, Jun YS, Waychunas GA, Navrotsky A. Energetic and structural studies of amorphous $\text{Ca}_{1-x}\text{Mg}_x\text{CO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($0 \leq x \leq 1$). *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2012 1;90:83–95.
25. De Yoreo JJ, Gilbert P, Sommerdijk N, Penn RL, Whitelam S, Joester D, et al. Crystallization by particle attachment in synthetic, biogenic, and geologic environments. *Science*. 2015 31;349(6247):aaa6760.
26. Cölfen H, Mann S. Higher-Order Organization by Mesoscale Self-Assembly and Transformation of Hybrid Nanostructures. *Angewandte Chemie International Edition*. 2003;42(21):2350–65.
27. Politi Y, Metzler RA, Abrecht M, Gilbert B, Wilt FH, Sagi I, et al. Transformation mechanism of amorphous calcium carbonate into calcite in the sea urchin larval spicule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 11;105(45):17362–6.
28. Weiss IM, Tuross N, Addadi L, Weiner S. Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *Journal of Experimental Zoology*. 2002;293(5):478–91.

29. Aizenberg J, Lambert G, Weiner S, Addadi L. Factors Involved in the Formation of Amorphous and Crystalline Calcium Carbonate: A Study of an Ascidian Skeleton. *J Am Chem Soc.* 2002 1;124(1):32–9.
30. Meldrum FC, Cölfen H. Controlling Mineral Morphologies and Structures in Biological and Synthetic Systems. *Chem Rev.* 2008 12;108(11):4332–432.
31. Aizenberg J, Addadi L, Weiner S, Lambert G. Stabilization of amorphous calcium carbonate by specialized macromolecules in biological and synthetic precipitates. *Adv Mater.* 1996;8(3):222–6.
32. Bentov S, Weil S, Glazer L, Sagi A, Berman A. Stabilization of amorphous calcium carbonate by phosphate rich organic matrix proteins and by single phosphoamino acids. *Journal of Structural Biology.* 2010 1;171(2):207–15.
33. Stephens CJ, Ladden SF, Meldrum FC, Christenson HK. Amorphous Calcium Carbonate is Stabilized in Confinement. *Adv Funct Mater.* 2010 2;20(13):2108–15.
34. Nudelman F, Sonmezler E, Bomans PH, With G, Sommerdijk N. Stabilization of amorphous calcium carbonate by controlling its particle size. *Nanoscale.* 2010 1;2(11):2436–9.
35. Benzerara K, Skouri-Panet F, Li J, Ferard C, Gugger M, Laurent T, et al. Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014 29;111(30):10933–8.
36. Li J, Margaret Oliver I, Cam N, Boudier T, Blondeau M, Leroy E, et al. Biomineralization Patterns of Intracellular Carbonatogenesis in Cyanobacteria: Molecular Hypotheses. *Minerals.* 2016 3;6(1):10.
37. Benzerara K, Bolzoni R, Monteil C, Beysac O, Forni O, Alonso B, et al. The gammaproteobacterium *Achromatium* forms intracellular amorphous calcium carbonate and not (crystalline) calcite. *Geobiology.* 2021;19(2):199–213.
38. Salman V, Yang T, Berben T, Klein F, Angert E, Teske A. Calcite-accumulating large sulfur bacteria of the genus *Achromatium* in Sippewissett Salt Marsh. *ISME J.* 2015;9(11):2503–14.
39. Couradeau E, Benzerara K, Gérard E, Moreira D, Bernard S, Brown GE, et al. An Early-Branching Microbialite Cyanobacterium Forms Intracellular Carbonates. *Science.* 2012 27;336(6080):459–62.
40. Moreira D, Tavera R, Benzerara K, Skouri-Panet F, Couradeau E, Gérard E, et al. Description of *Gloeomargarita lithophora* gen. nov., sp. nov., a thylakoid-bearing basal-branching cyanobacterium with intracellular carbonates, and proposal for Gloeomargaritales ord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 ;67(3):653–8.
41. Monteil CL, Perrière G, Menguy N, Ginet N, Alonso B, Waisbord N, et al. Genomic study of a novel magnetotactic Alphaproteobacteria uncovers the multiple ancestry of magnetotaxis. *Environ Microbiol.* 2018 Dec;20(12):4415–30.
42. Monteil CL, Benzerara K, Menguy N, Bidaud C, Michot-Achdjan E, Bolzoni R, et al. Intracellular amorphous Ca-carbonate and magnetite biomineralization by a magnetotactic bacterium affiliated to the Alphaproteobacteria. *ISME J.* 2021;15(1):1–18.
43. Faivre D, Schüler D. Magnetotactic Bacteria and Magnetosomes. *Chem Rev.* 2008 Nov 12;108(11):4875–98.
44. Grünberg K, Wawer C, Tebo BM, Schüler D. A Large Gene Cluster Encoding Several Magnetosome Proteins Is Conserved in Different Species of Magnetotactic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology.* 2001 ;67(10):4573–82.
45. Kasting JF. Earth's Early Atmosphere. *Science.* 1993 12;259(5097):920–6.
46. Planavsky NJ, Asael D, Hofmann A, Reinhard CT, Lalonde SV, Knudsen A, et al. Evidence for oxygenic photosynthesis half a billion years before the Great Oxidation Event. *Nature Geosci.* 2014 ;7(4):283–6.
47. Shaw GH. Earth's atmosphere – Hadean to early Proterozoic. *Geochemistry.* 2008 5;68(3):235–64.
48. Schirmermeister BE, Gugger M, Donoghue PCJ. Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils. *Palaeontology.* 2015;58(5):769–85.
49. Sosa Torres M, Saucedo-Vázquez J, Kroneck PH. The magic of dioxygen. In: Kroneck PMH, Sosa Torres ME (eds) *Sustaining life on planet earth: metalloenzymes mastering dioxygen and other chewy gases*, vol 15. 2015. Metal ions in life sciences. Springer International Publishing, pp 1–12.
50. Altermann W, Kazmierczak J, Oren A, Wright DT. Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history. *Geobiology.* 2006;4(3):147–66.
51. McFadden GI. Chloroplast Origin and Integration1. *Plant Physiology.* 2001 1;125(1):50–3.
52. Cavalier-Smith T. Chloroplast Evolution: Secondary Symbiogenesis and Multiple Losses. *Current Biology.* 2002 Jan 22;12(2):R62–4.
53. Daniell H, Lin CS, Yu M, Chang WJ. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biol.* 2016 23;17(1):134.

54. Garcia-Pichel F, Belnap J, Neuer S, Schanz F. Estimates of global cyanobacterial biomass and its distribution. *Algo Stud.* 2003 Aug 1;109(1):213–27.
55. Lochte K, Turley CM. Bacteria and cyanobacteria associated with phytodetritus in the deep sea. *Nature.* 1988;333(6168):67–9.
56. Fuhrman J. Genome sequences from the sea. *Nature.* 2003 Aug;424(6952):1001–2.
57. Price GD, Howitt SM. The cyanobacterial bicarbonate transporter BicA: its physiological role and the implications of structural similarities with human SLC26 transporters. This paper is one of a selection of papers published in a Special Issue entitled CSBMCB 53rd Annual Meeting — Membrane Proteins in Health and Disease, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochem Cell Biol.* 2011 ;89(2):178–88.
58. Yeates TO, Kerfeld CA, Heinhorst S, Cannon GC, Shively JM. Protein-based organelles in bacteria: carboxysomes and related microcompartments. *Nat Rev Microbiol.* 2008 ;6(9):681–91.
59. Ragon M, Benzerara K, Moreira D, Tavera R, Lopez-García P. 16S rDNA-based analysis reveals cosmopolitan occurrence but limited diversity of two cyanobacterial lineages with contrasted patterns of intracellular carbonate mineralization. *Front Microbiol.* 2014 8;5:1–11.
60. Benzerara K, Duprat E, Bitard-Feildel T, Caumes G, Cassier-Chauvat C, Chauvat F, et al. A New Gene Family Diagnostic for Intracellular Biomineralization of Amorphous Ca Carbonates by Cyanobacteria. Dagan T, editor. *Genome Biology and Evolution.* 2022 ;14(3):evac026.
61. Wever AD, Benzerara K, Coutaud M, Caumes G, Poinot M, Skouri-Panet F, et al. Evidence of high Ca uptake by cyanobacteria forming intracellular CaCO₃ and impact on their growth. *Geobiology.* 2019;17(6):676–90.
62. Bradley JA, Daille LK, Trivedi CB, Bojanowski CL, Stamps BW, Stevenson BS, et al. Carbonate-rich dendrolitic cones: insights into a modern analog for incipient microbialite formation, Little Hot Creek, Long Valley Caldera, California. *npj Biofilms Microbiomes.* 2017 Nov 21;3(1):1–11.
63. Cam N, Benzerara K, Georgelin T, Jaber M, Lambert JF, Poinot M, et al. Cyanobacterial formation of intracellular Ca-carbonates in undersaturated solutions. *Geobiology.* 2018;16(1):49–61.
64. Blondeau M, Benzerara K, Ferard C, Guigner JM, Poinot M, Coutaud M, et al. Impact of the cyanobacterium *Gloeomargarita lithophora* on the geochemical cycles of Sr and Ba. *Chemical Geology.* 2018 Apr;483:88–97.
65. Head IM, Gray ND, Babenzien HD, Oliver Glöckner F. Uncultured giant sulfur bacteria of the genus *Achromatium*. *FEMS Microbiology Ecology.* 2000 Sep 1;33(3):171–80.
66. Monteil CL, Vallenet D, Menguy N, Benzerara K, Barbe V, Fouteau S, et al. Ectosymbiotic bacteria at the origin of magnetoreception in a marine protist. *Nature Microbiology.* 2019 Jul;4(7):1088–95.
67. Cam N, Georgelin T, Jaber M, Lambert JF, Benzerara K. In vitro synthesis of amorphous Mg-, Ca-, Sr- and Ba-carbonates: What do we learn about intracellular calcification by cyanobacteria? *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 2015 Jul;161:36–49.
68. Bacchetta T, López-García P, Gutiérrez-Preciado A, Mehta N, Skouri-Panet F, Benzerara K, et al. Description of *Gloeomargarita ahousahtiae* sp. nov. (Gloeomargaritales), a thermophilic cyanobacterium with intracellular carbonate inclusions. *European Journal of Phycology.* 2023 Jun 15;0(0):1–10.
69. Mehta N, Benzerara K, Kocar BD, Chapon V. Sequestration of Radionuclides Radium-226 and Strontium-90 by Cyanobacteria Forming Intracellular Calcium Carbonates. *Environ Sci Technol.* 2019 5;53(21):12639–47.
70. Yu XC, Margolin W. Ca²⁺-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *EMBO J.* 1997 1;16(17):5455–63.
71. Komeili A, Li Z, Newman DK, Jensen GJ. Magnetosomes Are Cell Membrane Invaginations Organized by the Actin-Like Protein MamK. *Science.* 2006 13;311(5758):242–5.
72. Lamiable A, Bitard-Feildel T, Rebehmed J, Quintus F, Schoentgen F, Mornon JP, et al. A topology-based investigation of protein interaction sites using Hydrophobic Cluster Analysis. *Biochimie.* 2019 1;167:68–80.
73. Bull PC, Cox DW. Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends in Genetics.* 1994 1;10(7):246–52.
74. Kulaev IS, Vagabov VM. Polyphosphate metabolism in micro-organisms. *Adv Microb Physiol.* 1983;24:83–171.
75. Gray N, Head I. The Family *Achromatiaceae*. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. *The Prokaryotes Berlin, Heidelberg: Springer; 2014;1–14.*
76. Zurawell RW, Chen H, Burke JM, Prepas EE. Hepatotoxic Cyanobacteria: A Review of the Biological Importance of Microcystins in Freshwater Environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B.* 2005 14;8(1):1–37.

77. Harke MJ, Davis TW, Watson SB, Gobler CJ. Nutrient-Controlled Niche Differentiation of Western Lake Erie Cyanobacterial Populations Revealed via Metatranscriptomic Surveys. *Environ Sci Technol.* 2016 19;50(2):604–15.
78. Reynolds CS, Jaworski GHM, Cmiech HA, Leedale GF, Lund JWG. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis Aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences.* 1981 16;293(1068):419–77.
79. Worm J, Søndergaard M. Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (Cyanobacteria). *Aquatic Microbial Ecology.* 1998 2;14(1):19–28.
80. Casamatta DA, Wickstrom CE. Sensitivity of Two Disjunct Bacterioplankton Communities to Exudates from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kützing. *Microb Ecol.* 2000 1;40(1):64–73.
81. Jiang L, Yang L, Xiao L, Shi X, Gao G, Qin B. Quantitative studies on phosphorus transference occurring between *Microcystis aeruginosa* and its attached bacterium (*Pseudomonas* sp.). In: Qin B, Liu Z, Havens K, editors. *Eutrophication of Shallow Lakes with Special Reference to Lake Taihu, China 2007.* p. 161–5.
82. Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, Warren MJ, Smith AG. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature.* 2005 Nov;438(7064):90–3.
83. Briand E, Bormans M, Gugger M, Dorrestein PC, Gerwick WH. Changes in secondary metabolic profiles of *Microcystis aeruginosa* strains in response to intraspecific interactions. *Environmental Microbiology.* 2016;18(2):384–400.
84. Li M, Zhu W, Gao L, Lu L. Changes in extracellular polysaccharide content and morphology of *Microcystis aeruginosa* at different specific growth rates. *J Appl Phycol.* 2013 Aug 1;25(4):1023–30.
85. Oliver RL, Ganf GG. Freshwater Blooms. In: Whitton BA, Potts M, editors. *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space* Dordrecht: Springer Netherlands; 2002;p. 149–94.
86. Paerl HW, Millie DF. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia.* 1996 Nov 1;35(sup6):160–7.
87. Bishop CT, Anet EFLJ, Gorham PR. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can J Biochem Physiol.* 1959 1;37(3):453–71.
88. Park HD, Watanabe MF, Harada KI, Nagai H, Suzuki M, Watanabe M, et al. Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. *Natural Toxins.* 1993;1(6):353–60.
89. Sant'Anna CL, de Carvalho LR, Fiore MF, Silva-Stenico ME, Lorenzi AS, Rios FR, et al. Highly Toxic *Microcystis aeruginosa* Strain, Isolated from São Paulo—Brazil, Produce Hepatotoxins and Paralytic Shellfish Poison Neurotoxins. *Neurotox Res.* 2011 1;19(3):389–402.
90. Zhan L, Sakamoto H, Sakuraba M, Wu DS, Zhang LS, Suzuki T, et al. Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2004 Jan 10;557(1):1–6.
91. Lone Y, Bhide M, Koiri RK. Microcystin-LR Induced Immunotoxicity in Mammals. *Journal of Toxicology.* 2016 26;2016:e8048125.
92. de Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Gonçalves FJM, Pereira MJ. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2004 1;59(2):151–63.
93. Majsterek I, Sicinska P, Tarczynska M, Zalewski M, Walter Z. Toxicity of microcystin from cyanobacteria growing in a source of drinking water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 2004 1;139(1):175–9.
94. Deng J, Qin B, Paerl HW, Zhang Y, Ma J, Chen Y. Earlier and warmer springs increase cyanobacterial (*Microcystis* spp.) blooms in subtropical Lake Taihu, China. *Freshwater Biology.* 2014;59(5):1076–85.
95. Krausfeldt LE, Farmer AT, Castro Gonzalez HF, Zepernick BN, Campagna SR, Wilhelm SW. Urea Is Both a Carbon and Nitrogen Source for *Microcystis aeruginosa*: Tracking ¹³C Incorporation at Bloom pH Conditions. *Frontiers in Microbiology.* 2019;10:1.
96. Nishizawa T, Ueda A, Asayama M, Fujii K, Harada K, Ochi K, et al. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *J Biochem.* 2000;127(5):779–89.
97. Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Döhren H, Börner T, Neilan BA. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol.* 2000 ;7(10):753–64.

98. Harke MJ, Steffen MM, Gobler CJ, Otten TG, Wilhelm SW, Wood SA, et al. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae*. 2016 ;54:4–20.
99. Dick GJ, Duhaime MB, Evans JT, Errera RM, Godwin CM, Kharbush JJ, et al. The genetic and ecophysiological diversity of *Microcystis*. *Environ Microbiol*. 2021 Jun 14;1462-2920.15615.
100. Yang Z, Kong F, Shi X, Cao H. Morphological Response of *Microcystis aeruginosa* to Grazing by Different Sorts of Zooplankton. *Hydrobiologia*. 2006 1;563(1):225–30.
101. Konstantinidis KT, Ramette A, Tiedje JM. The bacterial species definition in the genomic era. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006 11;361(1475):1929–40.
102. Chan JZM, Halachev MR, Loman NJ, Constantinidou C, Pallen MJ. Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiology*. 2012 Dec 23;12(1):302.
103. Shapiro BJ. What Microbial Population Genomics Has Taught Us About Speciation. In: Polz MF, Rajora OP, editors. *Population Genomics: Microorganisms*. Cham: Springer International Publishing; 2019; p. 31–47.
104. Bobay LM, Ochman H. The Evolution of Bacterial Genome Architecture. *Frontiers in Genetics*. 2017;8:1.
105. Arevalo P, VanInsberghe D, Polz MF. A Reverse Ecology Framework for Bacteria and Archaea. In: Polz MF, Rajora OP, editors. *Population Genomics: Microorganisms*. Cham: Springer International Publishing; 2019; p. 77–96.
106. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, et al. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1987;37(4):463–4.
107. Otsuka S, Suda S, Shibata S, Oyaizu H, Matsumoto S, Watanabe MM. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001;51(3):873–9.
108. Kondo R, Yoshida T, Yuki Y, Hiroishi S. DNA-DNA reassociation among a bloom-forming cyanobacterial genus, *Microcystis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000;50(2):767–70.
109. Turrill WB. The Ecotype Concept. *New Phytologist*. 1946;45(1):34–43.
110. Cao H. Comprehensive and functional analyses reveal the genomic diversity and potential toxicity of *Microcystis*. *Harmful Algae*. 2022;11.
111. Lepere C, Wilmotte A, Meyer B. Molecular Diversity of *Microcystis* Strains (Cyanophyceae, Chroococcales) Based on 16S rDNA Sequences. *Systematics and Geography of Plants*. 2000;70(2):275.
112. Humbert JF, Barbe V, Latifi A, Gugger M, Calteau A, Coursin T, et al. A Tribute to Disorder in the Genome of the Bloom-Forming Freshwater Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *PLOS ONE*. 2013;12;8(8):e70747.
113. Cai H, McLimans CJ, Beyer JE, Krumholz LR, Hambright KD. *Microcystis* pangenome reveals cryptic diversity within and across morphospecies. *Science Advances*. 2023 13;9(2):eadd3783.
114. Huisman J, Codd GA, Paerl HW, Ibelings BW, Verspagen JMH, Visser PM. Cyanobacterial blooms. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(8):471–83.
115. Paerl HW, Huisman J. Blooms like It Hot. *Science*. 2008;320(5872):57–8.
116. Rabalais NN, Díaz RJ, Levin LA, Turner RE, Gilbert D, Zhang J. Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. *Biogeosciences*. 2010;12;7(2):585–619.
117. Reynolds CS. *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press; 2006. 437 p.
118. O’Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*. 2012 1;14:313–34.
119. Kosten S, Huszar VLM, Bécares E, Costa LS, van Donk E, Hansson LA, et al. Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Global Change Biology*. 2012 18(1):118–26.
120. Thomas RH, Walsby AE. Buoyancy Regulation in a Strain of *Microcystis*. *Microbiology*. 1985 1;131(4):799–809.
121. Kromkamp J, Konopka A, Mur LR. Buoyancy regulation in light-limited continuous cultures of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research*. 1988 1;10(2):171–83.
122. Kromkamp JC, Mur LR. Buoyant density changes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* due to changes in the cellular carbohydrate content. *FEMS Microbiology Letters*. 1984 1;25(1):105–9.
123. Thomas RH, Walsby AE. The Effect of Temperature on Recovery of Buoyancy by *Microcystis*. *Microbiology*. 1986;132(6):1665–72.
124. Brookes JD, Ganf GG. Variations in the buoyancy response of *Microcystis aeruginosa* to nitrogen, phosphorus and light. *Journal of Plankton Research*. 2001 1;23(12):1399–411.

125. Walsby AE, McAllister GK. Buoyancy regulation by *Microcystis* in Lake Okaro. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 1987;21(3):521–4.
126. Ibelings BW, Mur LR, Walsby AE. Diurnal changes in buoyancy and vertical distribution in populations of *Microcystis* in two shallow lakes. *Journal of Plankton Research*. 1991 1;13(2):419–36.
127. Walsby AE, Hayes PK, Boje R, Stal LJ. The selective advantage of buoyancy provided by gas vesicles for planktonic cyanobacteria in the Baltic Sea. *The New Phytologist*. 1997 ;136(3):407–17.
128. Preston T, Stewart WDP, Reynolds CS. Bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* overwinters on sediment surface. *Nature*. 1980 Nov;288(5789):365–7.
129. Latour D, Sabido O, Salençon MJ, Giraudet H. Dynamics and metabolic activity of the benthic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the Grangent reservoir (France). *Journal of Plankton Research*. 2004 1;26(7):719–26.
130. Fallon RD, Brock TD. Overwintering of *Microcystis* in Lake Mendota. *Freshwater Biology*. 1981;11(3):217–26.
131. Verspagen JMH, Snelder EOFM, Visser PM, Johnk KD, Ibelings BW, Mur LR, et al. Benthic-pelagic coupling in the population dynamics of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Freshwater Biol*. 2005;50(5):854–67.
132. Verspagen JMH, Snelder EOFM, Visser PM, Huisman J, Mur LR, Ibelings BW. Recruitment of Benthic *Microcystis* (cyanophyceae) to the Water Column: Internal Buoyancy Changes or Resuspension? *Journal of Phycology*. 2004;40(2):260–70.
133. Hansson LA, Rudstam LG, Johnson TB, Soranno P, Allen Y. Patterns in Algal Recruitment from Sediment to Water in a Dimictic, Eutrophic Lake. *Can J Fish Aquat Sci*. 1994 Dec 1;51(12):2825–33.
134. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis Aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin. *Phil Trans R Soc Lond B*. 1981 16;293(1068):419–77.
135. Head RM, Jones RI, Bailey-Watts AE. An assessment of the influence of recruitment from the sediment on the development of planktonic populations of cyanobacteria in a temperate mesotrophic lake. *Freshwater Biology*. 1999;41(4):759–69.
136. Takamura N, Yasuno M, Sugahara K. Overwintering of *Microcystis aeruginosa* Kütz. in a shallow lake. *Journal of Plankton Research*. 1984 1;6(6):1019–29.
137. Boström B, Pettersson AK, Ahlgren I. Seasonal dynamics of a cyanobacteria-dominated microbial community in surface sediments of a shallow, eutrophic lake. *Aquatic Science*. 1989 1;51(2):153–78.
138. Latour D, Salençon MJ, Reyss JL, Giraudet H. Sedimentary Imprint of *Microcystis Aeruginosa* (cyanobacteria) Blooms in Grangent Reservoir (loire, France)1. *Journal of Phycology*. 2007;43(3):417–25.
139. Zhang T, Lu X, Yu R, Qin M, Wei C, Hong S. Response of extracellular and intracellular alkaline phosphatase in *Microcystis aeruginosa* to organic phosphorus. *Environ Sci Pollut Res*. 2020 1;27(34):42304–12.
140. Zhang H, Huo S, Xiao Z, He Z, Yang J, Yeager KM, et al. Climate and Nutrient-Driven Regime Shifts of Cyanobacterial Communities in Low-Latitude Plateau Lakes. *Environ Sci Technol*. 2021 2;55(5):3408–18.
141. Song Y, Li R, Song W, Tang Y, Sun S, Mao G. *Microcystis* spp. and phosphorus in aquatic environments: A comprehensive review on their physiological and ecological interactions. *Science of The Total Environment*. 2023 20;878:163136.
142. Dyrman ST, Ammerman JW, Van Mooy BAS. Microbes and the marine Phosphorus Cycle. *Oceanography*. 2007;20(2):110–6.
143. Schindler DW. Eutrophication and Recovery in Experimental Lakes: Implications for Lake Management. *Science*. 1974 24;184(4139):897–9.
144. Schindler DW, Carpenter SR, Chapra SC, Hecky RE, Orihel DM. Reducing Phosphorus to Curb Lake Eutrophication is a Success. *Environ Sci Technol*. 2016 6;50(17):8923–9.
145. Smith SV. Phosphorus versus nitrogen limitation in the marine environment. *Limnology and Oceanography*. 1984;29(6):1149–60.
146. Harke MJ, Gobler CJ. Global Transcriptional Responses of the Toxic Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to Nitrogen Stress, Phosphorus Stress, and Growth on Organic Matter. Campbell DA, editor. *PLoS ONE*. 2013 23;8(7):e69834.
147. Harke MJ, Berry DL, Ammerman JW, Gobler CJ. Molecular Response of the Bloom-Forming Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to Phosphorus Limitation. *Microb Ecol*. 2012 1;63(1):188–98.
148. Carr NG, Whitton BA. *The Biology of Cyanobacteria*. University of California Press; 1982. 708 p.
149. Blomqvist P, Pettersson A, Hyenström P. Ammonium-nitrogen - a key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing cyanobacteria in aquatic systems. *Archiv fur Hydrobiologie*. 1994 132(2):141–64.

150. Hyenstrand P, Blomqvist P, Pettersson A. Factors determining cyanobacterial success in aquatic systems: A literature review. *Archiv für Hydrobiologie Spec Iss Advances in Limnology*. 1998 51:41–62.
151. Flores E, Herrero A. Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochemical Society Transactions*. 2005 1;33(1):164–7.
152. Ohtake A, Shirai M, Aida T, Mori N, Harada K, Matsuura K, et al. Toxicity of *Microcystis* species isolated from natural blooms and purification of the toxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989 55(12):3202–7.
153. Vezie C, Briant L, Sivonen K, Bertru G, Lefevre JC, Salkinoja-Salonen M. Variation of Microcystin Content of Cyanobacterial Blooms and Isolated Strains in Lake Grand-Lieu (France). *Microb Ecol*. 1998 1;35(2):126–35.
154. Davis TW, Berry DL, Boyer GL, Gobler CJ. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*. 2009 1;8(5):715–25.
155. Sabart M, Pobel D, Latour D, Robin J, Salençon MJ, Humbert JF. Spatiotemporal changes in the genetic diversity in French bloom-forming populations of the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports*. 2009 1(4):263–72.
156. Gobler CJ, Burkholder JM, Davis TW, Harke MJ, Johengen T, Stow CA, et al. The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*. 2016 1;54:87–97.
157. Steffen MM, Davis TW, McKay RML, Bullerjahn GS, Krausfeldt LE, Stough JMA, et al. Ecophysiological Examination of the Lake Erie *Microcystis* Bloom in 2014: Linkages between Biology and the Water Supply Shutdown of Toledo, OH. *Environ Sci Technol*. 2017 20;51(12):6745–55.
158. Kardinaal WEA, Tonk L, Janse I, Hol S, Slot P, Huisman J, et al. Competition for Light between Toxic and Nontoxic Strains of the Harmful Cyanobacterium *Microcystis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007 73(9):2939–46.
159. Bozarth CS, Schwartz AD, Shepardson JW, Colwell FS, Dreher TW. Population Turnover in a *Microcystis* Bloom Results in Predominantly Nontoxigenic Variants Late in the Season. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010 76(15):5207–13.
160. Pérez-Carrascal OM, Terrat Y, Giani A, Fortin N, Greer CW, Tromas N, et al. Coherence of *Microcystis* species revealed through population genomics. *ISME J*. 2019 13(12):2887–900.
161. Rinta-Kanto JM, Ouellette AJA, Boyer GL, Twiss MR, Bridgeman TB, Wilhelm SW. Quantification of Toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 Blooms in Western Lake Erie using Quantitative Real-Time PCR. *Environ Sci Technol*. 2005 1;39(11):4198–205.
162. Catherine A, Mouillot D, Escoffier N, Bernard C, Troussellier M. Cost effective prediction of the eutrophication status of lakes and reservoirs. *Freshwater Biology*. 2010;55(11):2425–35.

Chapitre 2 : La formation d'iACC est un phénomène répandu chez *Microcystis*

Le premier chapitre de cette thèse aborde la question de la formation d'iACC par le genre *Microcystis* dans des milieux naturels, et l'importance de ce phénomène au sein du genre. Si le nombre de cyanobactéries identifiées comme capable de former des iACC a beaucoup augmenté depuis la découverte de *Gloeomargarita lithopora* en 2012 (10, 24, 3), peu d'études se sont penchées sur leur abondance dans les milieux naturels. Seule l'étude de Ragon *et al.* 2014 (6) explore des tapis microbiens formés dans sources hydrothermales, dans lesquels les cyanobactéries iACC+ pouvaient être abondantes localement. C'est pourquoi, parmi la variété de cyanobactéries capables de former des iACC, le genre *Microcystis* est particulièrement intéressant. Sa répartition est en effet globale : la présence d'efflorescences à *Microcystis* a été répertoriée sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique (55). De nombreux lacs d'Ile-de-France sont par exemple soumis régulièrement à des efflorescences, les sites d'études étant donc abondants et facilement accessibles. De plus, nous avons identifié que certaines souches de *Microcystis* étaient capables de former des iACC quand d'autre n'en étaient pas capables (3). Enfin, lors des épisodes d'efflorescences, *Microcystis* représente une forte biomasse (55). Ainsi si les *Microcystis* formant des iACCs sont localement abondantes, les efflorescences peuvent avoir un fort impact sur le cycle du calcium.

Comme vu précédemment, la formation d'iACC n'était caractérisée avant ces travaux de thèse que dans 10 souches du genre *Microcystis*. En 2018, dans le cadre d'une collaboration avec le Muséum national d'Histoire Naturelle (Cécile Bernard, Charlotte Duval), des échantillons provenant d'un étang à Champs-Sur-Marne (Ile-de-France) ont été observés en microscopie électronique (MEB et STEM-HAADF) pour chercher la présence d'iACC en milieu naturel. En plus de l'observation de cellule de *Microcystis* contenant des iACC, la présence du gène *ccyA* a été détecté par PCR. Ces observations ont été réalisées par Karim Benzerara et Fériel Skouri-Panet

Cette observation a permis la mise en place d'un projet en collaboration entre l'IMPMC et l'équipe CCE du Muséum National d'Histoire Naturelle. En effet, 25 souches de *Microcystis* spp., isolées du lac de Champs-Sur-Marne (France), pour la plupart au cours du même événement d'efflorescence, étaient disponibles dans la collection du MNHN. Dans le cadre de mon Master 1, nous avons montré, en utilisant une combinaison de MEB, de STEM-HAADF et d'EDXS que 10 souches étaient capables de former des iACC, et que 15 n'en formaient pas. Après séquençage des souches, nous avons confirmé que le gène *ccyA* était présent dans le génome de ces 10 souches, et absent des 15 autres. La biominéralisation d'iACC semblait donc être un trait fonctionnel variable chez *Microcystis* au sein de cet environnement. L'extraction d'ADN pour le séquençage a été réalisé par Charlotte Duval (CCE, MNHN), et l'assemblage des génomes par Sébastien Halary (CCE, MNHN).

De nombreux lacs peu profonds de région parisienne sont régulièrement soumis à des efflorescences cyanobactériennes, et notamment à *Microcystis* (57). En tout, cinq lacs régulièrement soumis à des blooms de *Microcystis* en France et en Espagne ont été

échantillonnés entre 2018 et 2022. Deux des lacs, la base de loisir de Cergy-Pontoise et la base nautique de Verneuil-Sur-Seine, ont été sélectionnés et échantillonnés dans le cadre de ma thèse (voir chapitre 2). Les échantillons provenant de la Grande Paroisse nous ont été donnés par l'équipe CCE du Muséum National d'Histoire Naturelle dans le cadre d'une collaboration avec l'iEES. L'échantillon provenant du réservoir la Portiña nous a été fourni par David Moreira (ESE, Paris-Saclay). Pour chaque localisation, des clusters de cellules de *Microcystis* ont été identifiées par microscopie optique. Nous avons ensuite utilisé une combinaison de microscopie électronique à balayage (MEB) et de spectrométrie à rayon X (EDXS) pour observer les inclusions cellulaires présentes dans les cellules de *Microcystis* et analyser leur composition chimique. Les inclusions composées en majorité de P ont été interprétées comme des polyP, tandis que les inclusions ne contenant que très peu ou pas de P, mais riches en Ca, ont été interprétées comme des iACCs (Figure 4.3), sur la base d'études ultérieures (6,5,58). La présence de cellules formatrices d'iACC a été détectée dans les cinq lacs étudiés, montrant ainsi que la formation d'iACC semble être un phénomène répandu dans les environnements d'eau douce.

Enfin, nous avons exploré la répartition de cette capacité au sein du genre entier. Pour cela, le gène *ccyA* a été étudié dans les 256 génomes complets de haute qualité liés à *Microcystis*, disponibles dans les bases génomiques GenBank et NCBI. Environ un tiers de ces génomes (soit 93 sur 256) contenaient le gène *ccyA*. De plus, les génomes contenant le gène *ccyA* appartenaient à des souches provenant de 12 pays différents, et cinq continents (Asie, Europe, Afrique et Amérique du Nord et du Sud). La récupération et filtration des génomes, ainsi que la recherche du gène *ccyA*, a été réalisée par Maxime Millet (IMPMP) et Elodie Duprat (IMPMP). Nous avons déterminé comment les souches formant des iACC ont été distribuées phylogénétiquement au sein du genre. Pour ce faire, une analyse phylogénétique a été réalisée par Sébastien Hallary (CCE, MNHN). Les génotypes contenant le gène *ccyA* étaient largement distribués dans l'arbre phylogénétique, suggérant que la capacité de formation des iACC est répandue au sein du genre de *Microcystis*. Enfin, en regardant le ratio entre les souches *ccyA+* et *ccyA-* au sein de population issues du même événement d'efflorescence, on peut voir que celui-ci varie entre 0 et presque 100%. Il pourrait donc exister des paramètres environnementaux qui favoriseraient certaines souches selon qu'elles forment, ou non, des iACC.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Environmental Microbiology* en décembre 2022 (59).

Widespread formation of intracellular calcium carbonates by the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis*

Juliette Gaëtan^{1,2}, Sébastien Halary³, Maxime Millet¹, Cécile Bernard³, Charlotte Duval³, Sahima Hamlaoui³, Amandine Hecquet², Muriel Gugger⁴, Benjamin Lécuyer³, Neha Mehta¹, David Moreira⁵, Fériel Skouri-Panet¹, Cynthia Travert¹, Elodie Duprat¹, Julie Leloup², Karim Benzerara¹

¹Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS-SU-MNHN 7590. Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), Paris, France

²Sorbonne Université, UMR 7618 CNRS-INRA-IRD-Paris 7-UPEC. Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris (iEES-Paris), Paris, France.

³Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 7245 CNRS-MNHN. Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes, Paris, France

⁴Institut Pasteur, Université Paris Cité, Collection of Cyanobacteria, Paris, France

⁵Unité d'Ecologie Systématique et Evolution, CNRS, Université Paris-Saclay, AgroParisTech, Gif-sur-Yvette, France

Corresponding author: karim.benzerara@sorbonne-universite.fr

Data availability statement: Materials described in the manuscript will be freely available upon publication of the manuscript to any researcher wishing to use them for non-commercial purposes. Genomes of the 26 PMC strains have been deposited in ncbi (BioProject ID: PRJNA888979). All other datasets generated and/or analyzed during the current study (SEM/TEM) are available in the Zenodo repository, (doi: to be submitted).

Competing Interests statement: The authors declare no competing interest. The authors declare no competing financial interest

Funding statement: This work was supported by the ATM MNHN BIOCHEMIST project and the Emergence CaCO₃ project of Sorbonne University. Maxime Millet's grant was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR PHOSTORE, ANR-19-CE01-0005). Juliette Gaëtan PhD grant was funded by the Learning Planet Institute and University Paris Cité grant Frontiers of Innovation in Research and Education.

Originality-Significance Statement: This work reports the discovery of the pervasiveness of intracellular calcium carbonate inclusions in the *Microcystis*, a biological trait that has not been reported before despite intensive research on this cyanobacterial genus. This trait may confer to these blooming bacteria some overlooked geochemical importance in Ca geochemical cycle

1 Abstract

The formation of intracellular amorphous calcium carbonates (iACC) has been recently observed in a few cultured strains of *Microcystis*, a potentially toxic bloom-forming cyanobacterium found worldwide in freshwater ecosystems. If iACC-forming *Microcystis* are abundant within blooms, they may represent a significant amount of particulate Ca. Here we investigate the significance of iACC biomineralization by *Microcystis*. First, the presence of iACC-forming *Microcystis* cells has been detected in several eutrophic lakes, indicating that this phenomenon occurs under environmental conditions. Second, some genotypic (presence/absence of *ccyA*, a marker gene of iACC biomineralization) and phenotypic (presence/absence of iACC) diversity have been detected within a collection of strains isolated from one single lake. This illustrates that this trait is frequent but also variable within *Microcystis* even at a single locality. Finally, one-third of publicly available genomes of *Microcystis* were shown to contain the *ccyA* gene, revealing a wide geographic and phylogenetic distribution within the genus. Overall, the present work shows that the formation of iACC by *Microcystis* is common under environmental conditions. While its biological function remains undetermined, this process should be further considered regarding the biology of *Microcystis* and implications on the Ca geochemical cycle in freshwater environments.

2 Introduction

A broad phylogenetic diversity of bacteria affiliated with Cyanobacteria, Alphaproteobacteria, and Gammaproteobacteria can form intracellular amorphous calcium carbonates (iACC) (1–3). Through this process, cells sequester significant amounts of calcium (Ca) and inorganic carbon (C) intracellularly (4,5). Currently, iACC have been formally identified by electron microscopy in more than 20 cyanobacteria affiliated with diverse genera, families, and orders, originating from environments such as soils, hot springs, and fresh or brine water bodies (3,5,6). While the precise molecular mechanisms of intracellular iACC biomineralization remain unclear, this process has been proved to occur even under chemical conditions that are thermodynamically not favorable to iACC precipitation (7). Therefore, it involves some energy cost for the cells that may relate to active intracellular sequestration of Ca within a dedicated intracellular compartment, the biochemical composition of which remains unknown (7,8). Consistently with this active sequestration of Ca, iACC-forming cyanobacteria tend to incorporate more Ca than other cyanobacteria under laboratory conditions (5,7). As a result, they substantially decrease the concentration of extracellular Ca in their growth medium (7). The function of iACC granules in cyanobacteria remains unknown but they have been hypothesized to serve as ballasts by dramatically increasing the buoyant density of the cells (9), or as a pH buffer during photosynthesis (10), or an inorganic C reservoir (11), these few hypotheses being not exclusive.

Based on these observations, it has been advocated that iACC biomineralization is genetically controlled. Accordingly, a recently identified gene family, named *ccyA*, was shown to be linked with iACC formation in cyanobacteria (3). While the precise function of this gene family remains to be determined, some genomic and genetic analyses support a pivotal role in iACC biomineralization. This gene was searched in 594 GenBank genome assemblies assigned to cyanobacteria (published before December 1st, 2017) (3). Among them, 27 genomes contained *ccyA*, and 12 were affiliated with the *Microcystis* genus. Eight of these *Microcystis* strains related to *ccyA*-containing genomes were cultured under standard laboratory conditions and further analyzed by electron microscopy, and 6 formed iACC. This first identification of iACC in *Microcystis* showed that this trait had been overlooked so far in an otherwise extensively studied cyanobacterium.

Microcystis is among the most common bloom-forming cyanobacteria in freshwater ecosystems worldwide, and some ecotypes are toxic for humans and wildlife (12). Several factors have been proposed to explain the ecological success of *Microcystis*. They include the high cellular efficiency in taking up nutrients and inorganic C (13,14) and their ability to migrate vertically owing to specialized gas vesicles and high-density intracellular formations (12,15–17). These factors may *a priori* influence or are influenced by the capability of some *Microcystis* ecotypes to form iACC. However, presently there is no assessment of the commonness of iACC formation by *Microcystis*. Thus, we have combined microscopy and genomic analyses to determine the importance of iACC biomineralization by *Microcystis*. First, we analyzed *Microcystis* cells *in situ* in several lakes experiencing blooms seasonally. Second, we studied the phenotypic and genotypic diversity regarding iACC formation in a collection of *Microcystis* strains isolated from a single lake. Finally, we assess the distribution of the capability to form iACC within the *Microcystis* genus by genomic analyses.

3 Experimental Procedures

3.1 Sampling sites

Surface water samples were collected at five distinct locations to assess the presence of iACC in diverse *Microcystis* populations (Table I.I; Figure S2.1). All sampled water bodies are affected by human activity (18). The sites of Champs-sur-Marne, Verneuil-sur-Seine, Cergy-Pontoise, and Grande Paroisse, are recreational lakes located in the suburban area of Paris, Ile-de-France, and are known to have experienced recurrent episodes of cyanobacterial blooms, including *Microcystis* ones, over the recent years (19–22). Champs-Sur-Marne, Verneuil-sur-Seine, and Cergy-Pontoise recreational areas were former quarries of alluvial and sand sediments, which were flooded between the 1940s and 1980s. La Portiña reservoir in Spain was flooded in 1947, in a granitoid bedrock, and has been used as a water supply since then (22).

For the sites of Champs-sur-Marne, Verneuil-sur-Seine and Cergy-Pontoise, identification of *Microcystis* cells by light microscopy was conducted by the service

“Expertises environnementales” at the MCAM research unit (MNHN) (Figure S2.2). No identification by light microscopy was conducted for La Portiña and Grande Paroisse and were recognized based on their characteristic morphology by scanning electron microscopy.

Table II.I. Name and localization of studied water bodies

Name	City	Country	GPS	Date of sample collection for electron microscopy analyses	Strains isolation and sequencing
Grosse Pierre Pond	Verneuil-Sur-Seine	France	48.991306, 1.970930	20/10/2021	No
Les Galets Pond	Cergy-Pontoise	France	49.025860, 2.048909	18/09/2020 and 20/07/2021	No
Champs-sur-Marne recreational area	Champs-Sur-Marne	France	48.863889, 2.598056	08/10/2018 and 22/10/2018	Yes
La Noue de Notre Dame Pond	Grande Paroisse	France	48.375313, 2.901146	25/01/2022	No
Juanon reservoir	Valence	France	45.394166, 5.031944	No observation	Yes
Portiña reservoir	Portiña	Spain	40.000674, -4.842435	31/12/2021	No

3.2 Cultures of cyanobacterial strains

For culture experiments, twenty-four strains of *Microcystis* spp. were selected from the Paris Museum Collection (PMC) (Table SI.I). They all originated from the same recreational pond in Champs-Sur-Marne (Ile-de-France, France), and their sequenced genomes were of good quality (completeness > 95% or contamination < 5%). All strains corresponded to non-axenic single clones of *Microcystis*. For the observations shown in the present manuscript, all strains were grown in a standard Z8 medium (23), without agitation, at 25°C with an 18:8 (day/night) photoperiod and a light intensity of 10 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Except for strains PMC 568.08 and PMC 569.08, the same conditions were also used for strain curation. For curation, strains PMC 568.08 and PMC 569.08 were grown at 18°C with a 13:11 photoperiod (day/night) and a light intensity of 8 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.3 Scanning electron microscopy (SEM)

Sample preparation for SEM was performed following a protocol previously tested on several iACC-forming strains, as described by (5,9). Briefly, cell suspensions from laboratory cultures and field water samples were filtered on 0.22 μm isopore polycarbonate filters, then rinsed three times with 10 mL MilliQ® water. Filters were air-dried at ambient temperature and mounted on aluminum stubs using double-sided carbon tape. It is well known that air-

drying induces morphological artifacts such as cell shrinkage or cell-collapse. These artifacts are usually overcome by using techniques such as critical point drying. However, because of the use of chemicals, the latter approach induces iACC dissolution, whereas air-drying does not (9). Filters were coated by carbon evaporation to allow the conduction of electrons at the surface of samples for SEM analyses. SEM observations were performed using a Zeiss™Ultra55 SEM. The electron accelerating voltage was 10 or 15 kV with a working distance of 7.5 mm and a 60 µm aperture. Images were collected with a backscattered electron detector (AsB detector). Energy-dispersive X-ray spectrometry (EDXS) data were acquired using an EDS Bruker QUANTAX detector providing hyperspectral images (HyperMap), which were analyzed using the Esprit software (Brucker).

3.4 Scanning transmission electron microscopy (STEM)

Sample preparation for STEM was performed following a protocol previously tested on several iACC-forming strains, as described in (9,24). The cell pellets of *Microcystis* cultures were harvested by centrifugation (6600 *g* for 10 min) and then rinsed thrice with MilliQ® water. The cell pellets were re-suspended in 100-200 µL of MilliQ® water. A 3 to 6 µL aliquot was deposited on a carbon-coated 100- or 200-mesh copper grid and air-dried at ambient temperature. STEM analyses were performed using a JEOL-2100F microscope operated at 200 kV, equipped with a field emission gun, a JEOL detector, and a STEM device, which allows Z-contrast imaging in the high-angle annular dark field (HAADF) mode. Compositional mapping was acquired by performing EDXS analysis in the STEM-HAADF mode.

3.5 Genome sequencing and analyses

For genome sequencing, 28 strains of *Microcystis* spp. were selected from the Paris Museum Collection (PMC) including 25 originating from Champs-Sur-Marne (France), and three isolated from another pond in Valence (France) (Table S-I and S-II). The 24 strains from Champs-sur-Marne used for cultures were among the 25 ones selected for genome sequencing. Strains were isolated as previously described (25). All strains were grown at 25°C for one month with a 16:8 photoperiod (day/night) and at a light intensity of 10-15 µmol photon m⁻²s⁻¹. After centrifugation (3220 *g* for 15 min), the pellets were frozen at -80°C, then lyophilized for 24 h. DNA was extracted from 8 to 10 mg of biomass using the ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, CA) following the manufacturer's instructions, and sequenced using a 2x150 bp paired-reads strategy on an Illumina MiSeq platform.

Sequence datasets were corrected and assembled by SPAdes v3.12.0 (26) using default parameters, producing contigs belonging to *M. aeruginosa* or heterotrophic bacteria also present in the cultures. A synergistic approach allowed to extract sequences belonging to *M. aeruginosa* by (i) binning contigs using MyCC (27) based on several parameters, including sequence coverages obtained with bowtie2 (28), and (ii) taxonomic annotating using CAT (29). Two genomes (PMC 823.12 and PMC 729.11) were of poor quality (completeness < 95% or contamination > 5%) (Table SII.I and SII.II).

Additional genome assemblies belonging to the *Microcystis* genus were retrieved from the NCBI FTP server using both the genus name and children taxonomic identifiers of 1125 [*Microcystis*] on the 14th of January 2022. In total, 344 assemblies were collected from GenBank and/or RefSeq databases. Cross-references and assemblies belonging to the same strain were removed from the dataset, resulting in a final set of 278 assemblies. These assemblies were processed through CheckM to assess their quality (30) and Prodigal to predict their features when NCBI annotations were not available (29).

3.6 Search for *ccyA* in available genomes

The calcyanin protein, encoded by the *ccyA* gene, has been shown to be composed of two domains: a variable N-terminal domain and a conserved C-terminal domain (3). The conserved C-terminal domain of the 35 calcyanin protein sequences previously identified in cyanobacterial genomes was searched against the 256 genomes *Microcystis* assemblies showing a good quality (completeness > 95% and contamination < 5%) using the corresponding generated HMM profile (3) and the *hmmsearch* tool from HMMER (31). The sequence hits matching the profile with coverage greater than 62% and an *E*-value lower than $1e-30$ were finely annotated using 3 HMM profiles corresponding to the 3 different GlyZip motifs that compose the complete C-terminal domain of the calcyanin protein. The N-terminal domain family of each full-length calcyanin was annotated using the BLASTp program. The 35 known *ccyA* N-terminal domains were used as a database. Overall, the hits were retained if they showed a complete C-terminal domain and a match against a known N-terminal domain with a minimum coverage of 80% (*E*-value < $1e-7$). In addition, the retained sequences were searched in all *Microcystis* genomes using tBLASTn.

3.7 Phylogenetic analyses

A core genome consisting of 80 single-copy genes shared by (i) the 28 newly sequenced PMC *Microcystis* genomes, (ii) the 278 non-redundant publicly available *Microcystis* genome assemblies, and (iii) two outgroups (*Chroococcus* sp. FPU101 and *Merismopedia glauca* CCAP 1448/3) was retrieved using Roary (32) (minimal identity $\geq 80\%$). The concatenated gene sequences were aligned using MAFFT v7.453 (33) and used to infer a phylogenetic tree using RaxML v8.2.12 (34) (GTRGAMMA model, 100 bootstraps). Out of the analyzed 306 genomes, 282 (256 retrieved from the NCBI FTP server and 26 newly sequenced genomes from PMC collection) were of good quality (completeness > 95% and contamination < 5%) and kept for this analysis. The phylogenetic tree was displayed and annotated using iTOL (35).

4 Results

4.1 Detection of iACC-forming *Microcystis* in lakes

Cell clusters with typical *Microcystis* morphology were detected based on light microscopy and/or electron microscopy in the five lakes (Ile-de-France and Toledo-Spain) known to recurrently experience cyanobacterial blooms (Figure 2.1, 2.2, S2.2-S2.4). Cells

were systematically imaged by SEM (Figure 2.1). In all five lakes, many *Microcystis* cells contained intracellular inclusions, from a dozen (Figure 2.1K-L) up to ~50 inclusions per cell (Figure 2.1T). Their elemental composition was determined using energy-dispersive X-ray spectrometry (EDXS). Two types of inclusions were identified: (i) inclusions of the first type were composed of P as the major element, with some Mg, K, and sometimes Ca, and were interpreted as polyphosphate granules (PolyP) (Figure 2.1C and 1E); (ii) the other type of inclusions were rich in Ca and contained little to no P (Figure 2.1C and 1D), which is characteristic of iACC inclusions in cyanobacteria (5,7,24). iACC inclusions were observed in *Microcystis* cells from all five lakes. In several samples, the distribution of iACC inclusions in cells was heterogeneous: for example, in La Portiña, within the same *Microcystis* cell cluster, both cells with numerous iACC inclusions (Figure 2A, B, circle 2) and cells with only a few or no inclusion at all (Figure 2.2A, B, circle 1) were observed. Finally, among cells with intracellular inclusions, some cells contained both PolyP and iACC (Figure 2.1A-C, F-H and S-U; Figure 2.3), some contained PolyP only (Figure 2.4), and a few contained iACC inclusions only (Figure 2.1 K-M and O-Q; Figure 2.2).

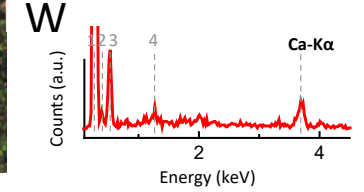
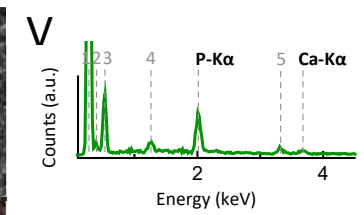
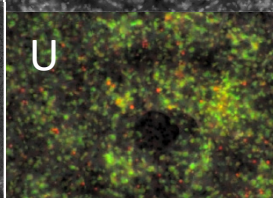
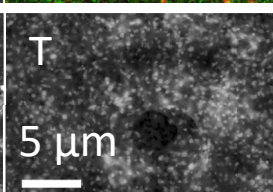
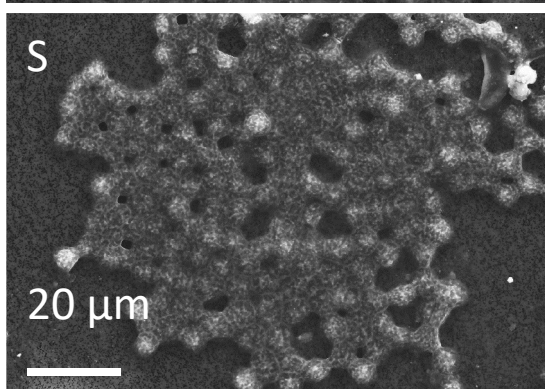
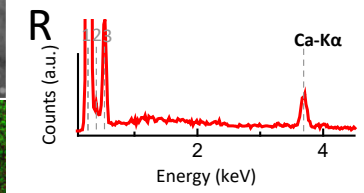
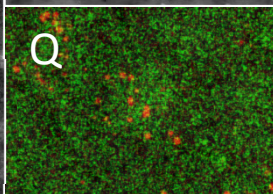
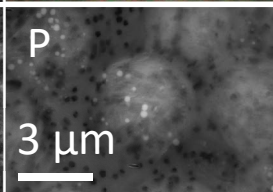
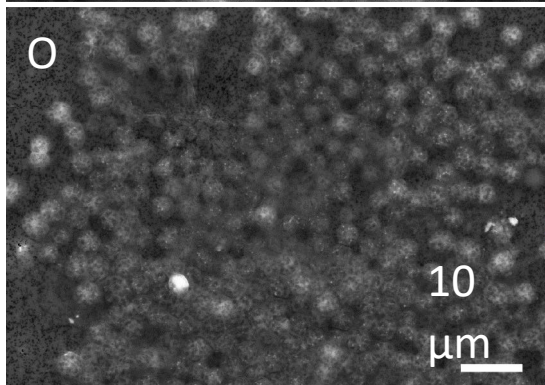
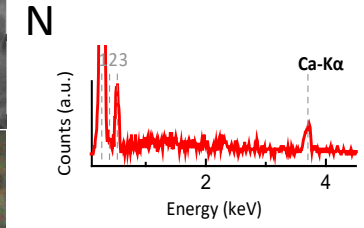
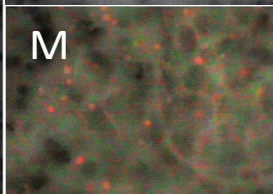
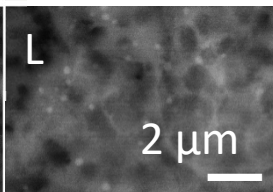
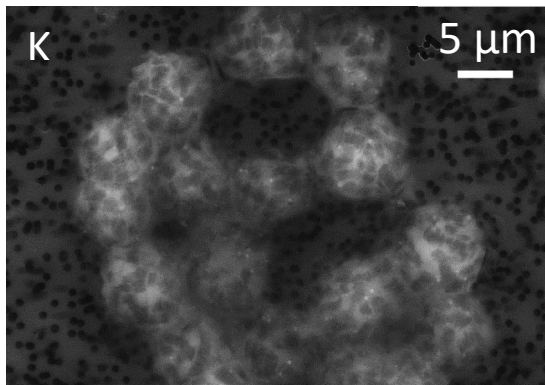
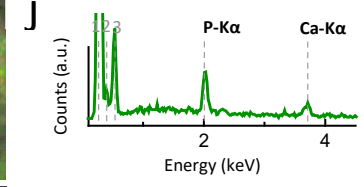
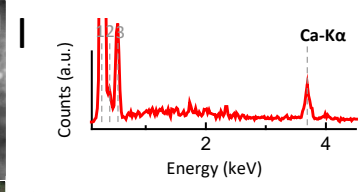
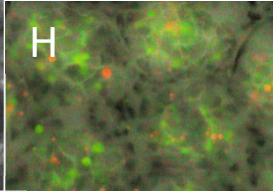
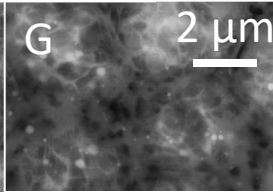
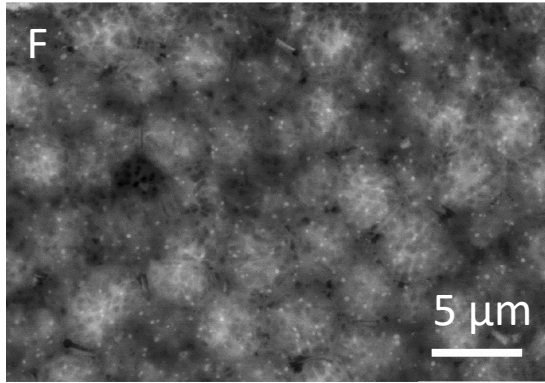
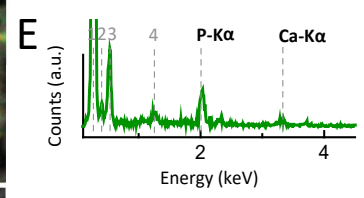
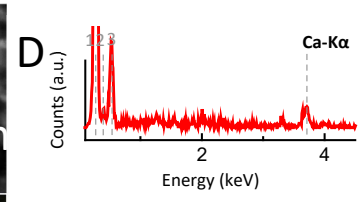
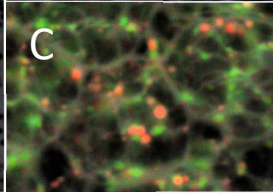
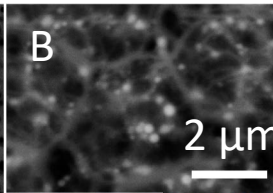
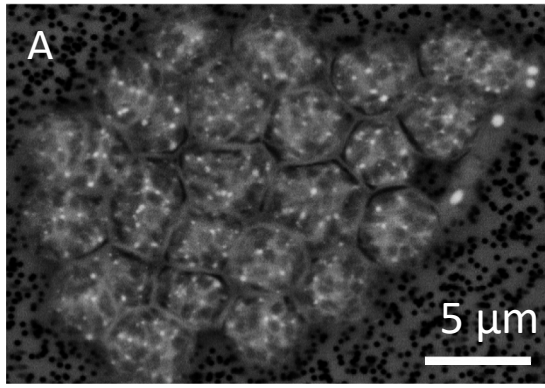


Figure 2.1 SEM analyses of Microcystis forming iACC and PolyP granules in freshwater lakes. (A-E): SEM image in AsB detection mode of *Microcystis* cells observed in samples from Champs-Sur-Marne (IdF-France). SEM images in AsB detection mode of a close-up view of the *Microcystis* cells. Corresponding overlay of the AsB image and SEM-EDX maps of Ca (red) and P (green). As a result, iACC appear in red and PolyP granules in green. EDXS spectra of iACC granules (red spots) and PolyP granules (green spots). (F-J): same type data for Verneuil (IdF-France). (K-N): same type of data for Cergy-Pontoise (IdF-France) with only an EDXS spectrum of iACC. (O-R): same type of data for Portiña (Toledo – Spain) with only an EDXS spectrum of iACC. (S-W): same type of data for Grande Paroisse (IdF-France). The labels of the emission lines in the EDXS spectra are: (1): C K α ; (2) N K α ; (3) O K α ; (4) Mg K α ; (5) K K α .

4.2 Detection of both iACC and the *ccyA* gene in cultivated *Microcystis* strains isolated from a single lake

Twenty-four *Microcystis* spp. strains isolated from the Champs-Sur-Marne lake (France) were investigated for their phenotypic and genotypic diversity (Table SII.I). Two strains were isolated in 2008, while the 22 others were isolated in August 2011 (18 strains) and in October 2011 (4 strains). Electron microscopy analyses showed that all strains contained PolyP inclusions, which can be morphologically but not chemically confused with iACC inclusions (Figure 2.5, Figure S2.3 and S4). By contrast, iACC inclusions were detected only in the cells of 7 strains by SEM and SEM-EDX analyses, as indicated by their relatively high contrast, high Ca content, and negligible P content (Figure S2.4). SEM analyses for the PMC 820.12 and PMC 831.12 strains were more ambiguous. Indeed, a Ca signal could be detected in the spectra obtained on the whole cells, but it was difficult to spatially discriminate from the P signal. Therefore, these two strains were further analyzed by STEM-HAADF, which provides a higher spatial resolution than SEM. This unambiguously showed that these two strains contained iACC (Figure 2.5 A-D and H-K). Overall, electron microscopy revealed that 9 out of 24 strains (37.5%) contain iACC.

In parallel, the genomes of these 24 strains were sequenced and used to search for the *ccyA* gene. This gene was detected in all 9 strains forming iACC, and was absent from the genomes of the 15 other strains. Moreover, the N-terminal domains of all the calcyanins belonged to the same homologous family (sharing at least 88.3% identity between their amino acids sequences) corresponding to the one (named Z-type) previously identified for *Microcystis* (3).

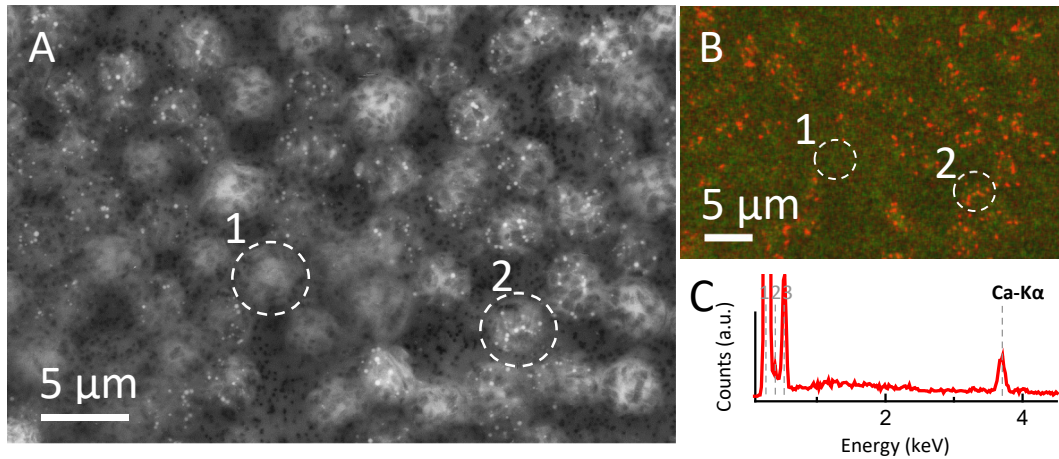


Figure 2.2 SEM analyses of *Microcystis* cells from La Portiña with some cells containing iACC inclusions and some not containing iACC. (A) SEM image in AsB detection mode of a group of *Microcystis* cells collected from La Portiña (Toledo-Spain). (B) Overlay of AsB image and SEM-EDX maps of Ca (red) and P (green). As a result, iACC appear in red. (C) EDXS spectrum of iACC granules (red spots) shown in circle 2 in B. The labels of the emission lines in the EDXS spectra are the same as in Fig. 1.

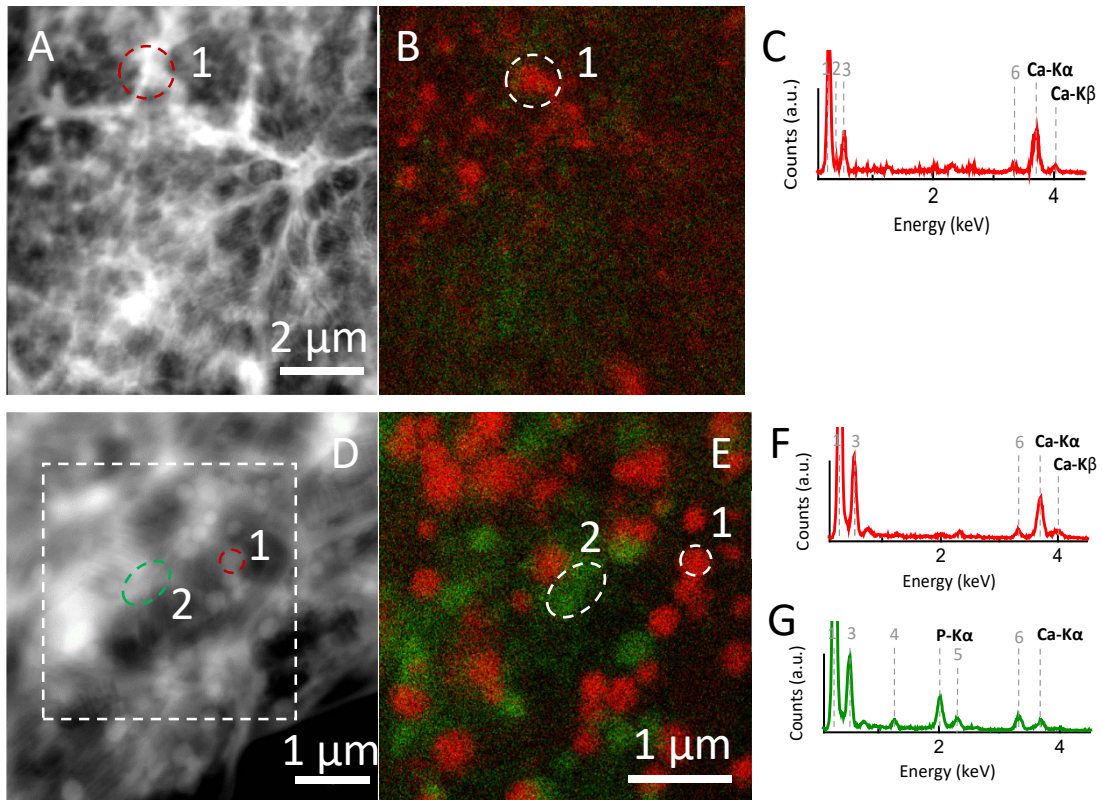


Figure 2.3 TEM analyses of *Microcystis* cells forming iACC and PolyP granules collected in freshwater lakes. (A): STEM-HAADF image of *Microcystis* cells observed in Champs-Sur-Marne (IdF-France). (B): Corresponding STEM-EDX map of Ca (red) and P (green). iACC inclusions appear in red and PolyP granules in green. (C): EDXS spectrum acquired on the iACC inclusion outlined in (B). (D-G): same analyses on *Microcystis* cells collected in Cergy-Pontoise. The labels of the emission lines in the EDXS spectra are (4) Mg K α ; (5) S K α ; (6): K K α .

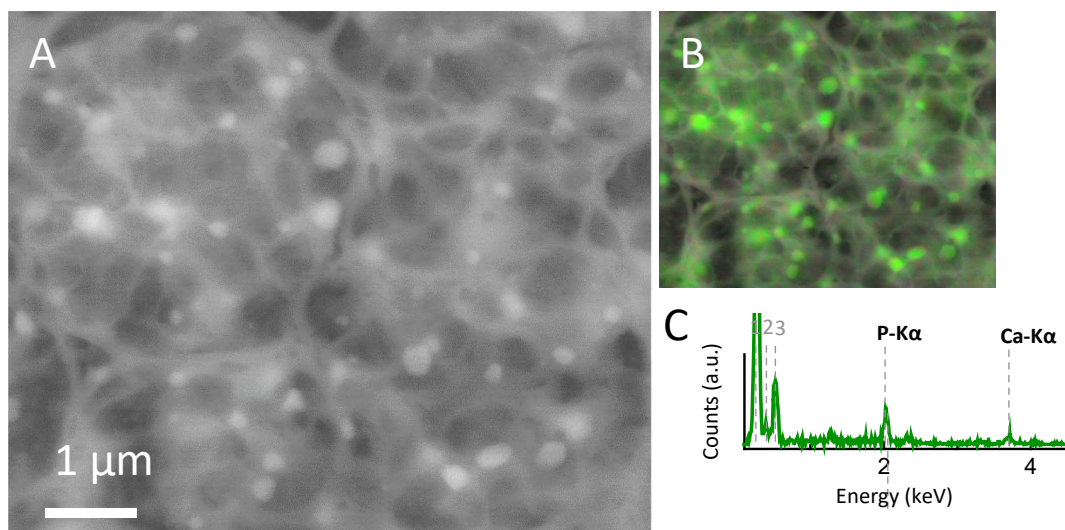


Figure 2.4 SEM analyses of *Microcystis* cells forming PolyP only. (A) SEM image taken in the AsB detection mode of a cluster of *Microcystis* cells observed in the Cergy-Pontoise lake. (B) Overlay of AsB image and SEM-EDX maps of Ca (red) and P (green). As a result, PolyP granules appear in green. (C) EDXS spectrum of green spots shown in B.

4.3 Search for full-length homologs of the *ccyA* gene in *Microcystis* genomes from public databases

To go further, 256 complete genome assemblies of high quality affiliated with the *Microcystis* genus were retrieved from the curated NCBI genomic databases. Twenty-six newly sequenced genomes of *Microcystis* PMC strains were added to this dataset: the above-described 24 genomes of strains isolated from Champs-Sur-Marne, and two additional genomes of strains from Valence, France. Overall, the *ccyA* gene was found in 93 out of the 282 *Microcystis* genomes assemblies (Table SII.I). The *ccyA* gene was present in single copy in all genomes where it was detected. Among these 93 *ccyA*+ genomes, 84 were already in NCBI databases and nine belonged to our newly sequenced genomes of PMC strains. All these *ccyA* sequences were well conserved (sharing at least 72.6% identity) and their N-terminal domain all belong to the same Z-type family.

The obtained *ccyA* dataset contained sequences from both cultured strains and metagenome-assembled genomes (MAGs), the latter representing a significant number of available *Microcystis* genomes (148 out of the 282 genomes; 38 *ccyA*+ MAGs out of the identified 93 *ccyA*+ genomes) (Table SI.I). Moreover, *ccyA*+ genotypes were recovered from multiple geographic locations, spanning 12 different countries over five continents (Asia, Europe, Africa, and North and South America), showing the cosmopolitanism of this gene. This considerably extends the assessment of *ccyA* distribution in the *Microcystis* genus compared with the 12 *Microcystis ccyA*+-genomes that were known up to now (3).

To better assess the link between phylogeny and the distribution of *ccyA* in *Microcystis*, a phylogenomic tree was built based on a core genome composed of 80 single-copy genes (Figure 2.6). Several genotypic groups, previously defined by Pérez-Carrascal *et al.* (2019)

(36) and modified by Dick *et al.* (2021) (37), based on the 16S-23S internal transcribed spacer (ITSc), are reported in our analysis (Figure 2.6). Except for the Mae 3_3 genotypic group, which is inserted within the Mae 3_2 group in this study, all other genotypic groups were recovered in our phylogenomic analysis. Moreover, all the newly sequenced PMC strains, except one (PMC 568), were closely related to four existing genotypic groups: four strains within Mae 4, 13 within Mae 8, seven within Mae 7, and one within the Mae 3_1 cluster.

To better assess the link between geography and the distribution of *ccyA* within *Microcystis*, a total of 16 geographic groups (*i.e.*, sets of at least 3 good-quality genomes of organisms isolated from a given geographic location, at the same time period) were defined (Table SII.III). These groups were broadly distributed across the phylogenetic tree. Seven geographic groups (geographic groups 3, 5, 6, 7, 9, 15 and 16) contained both *ccyA*⁺ and *ccyA*⁻ genomes, one (geographic group 11) contained *ccyA*⁺ genomes only, and the other seven (geographic groups 1,2, 4, 8, 10, 13 and 14) contained *ccyA*⁻ genomes only. Interestingly, while most of these groups contained less than 10 genomes, four comprised more than 25 genomes. One group, geographic group 7, comprised 26 genomes sequenced during a bloom event in 2018 (Lake Pampulha, Brazil) and was mostly composed of *ccyA*⁺ genomes (23 over 26). Two other large groups of genomes (geographic groups 13 and 14) were retrieved from Lake Champlain (Canada) in 2017 and 2018. They comprise 41 and 32 high-quality genome assemblies, respectively, none containing *ccyA*. In contrast with these three large geographic groups, which had a pronounced bias towards *ccyA*⁺ or *ccyA*⁻, the one identified in Champs-Sur-Marne (geographic group 17) showed similar proportions of *ccyA*⁺ and *ccyA*⁻ genomes.

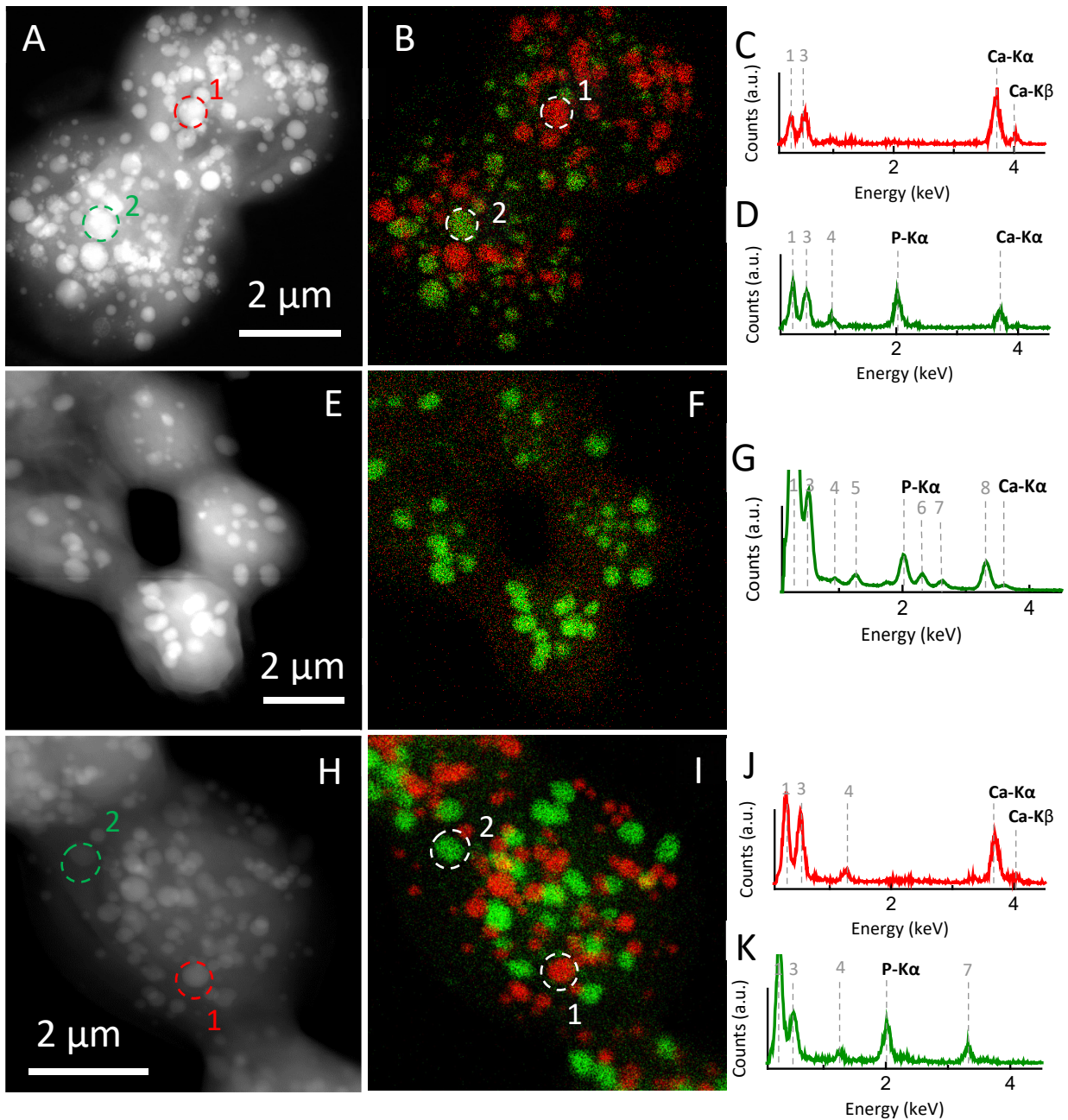


Figure 2.5 TEM analyses of *Microcystis* cultured strains. (A-D): STEM-HAADF image of two cells of *Microcystis* PMC 831.12, which form both iACC and PolyP granules; corresponding STEM-EDX maps of Ca (red) and P (green). As a result, iACC granules appear in red and PolyP granules in green; EDXS spectra measured on the iACC and PolyP granules outlined in A and B. (E-G): same data for cells of *Microcystis* PMC 813.12, which form PolyP granules only. The labels of the emission lines in the EDXS spectra are: (1): C K α ; (3) O K α ; (4) Na K α ; (5) Mg K α ; (6): S K α ; (7): Cl K α ; (8): K K α . (H-K): same data for cells of *Microcystis* PMC 820.12, which form both iACC and PolyP granules.

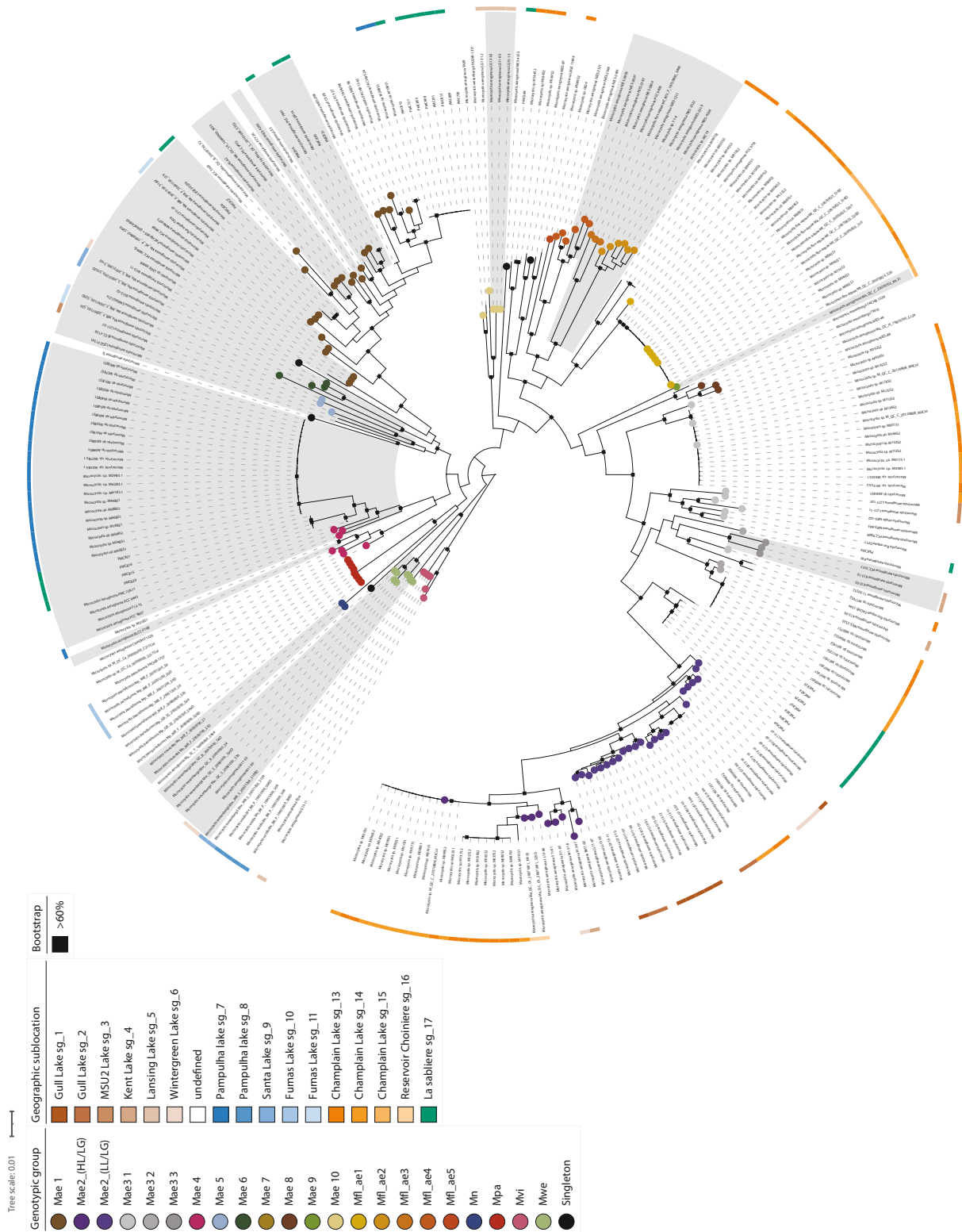


Figure 2.6 Phylogenomic tree of *Microcystis*. The colored outer ring indicates the geographic sublocation of the genomes based on their geographic origin and time of isolation (Table S-III); see color code on the figure. Genomic assemblies containing the *ccyA* gene are shadowed in blue. Colored circles at the tips of the tree branches indicate genotypic groups as defined in the literature; see color code on the figure. Nodes with a bootstrap value over 60% are represented as filled black squares.

5 Discussion

5.1 The overlooked prevalence of iACC biomineralization by *Microcystis*

This study shows that the formation of iACC by *Microcystis* is very common. It may seem surprising that this trait was not described before, considering the numerous past observations of *Microcystis* blooms. Recently, Benzerara et al. (2022) (3) reported the detection of (i) the *ccyA* gene, a reliable marker of iACC biomineralization, in 12 *Microcystis* genome assemblies and (ii) iACC in 6 of the corresponding *Microcystis* strains that could be observed, all coming from the Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria (PCC). Here, we observed iACC in 9 out of 24 strains from the Paris Museum Collection (PMC) and identified 93 genomes of *Microcystis* containing the *ccyA* gene, retrieved from all around the world. These results significantly extend the prevalence of iACC biomineralization by *Microcystis* and confirm the strong correlation between the presence of *ccyA* and the formation of iACC: this correlation was perfect for the 24 PMC strains from Champs-Sur- ne. This strongly supports the premise that iACC biomineralization capabilities can be predicted in *Microcystis* strains based on the presence/absence of the *ccyA* gene. Yet, it should be noted that despite the robustness of this correlation, few ‘false positives’ cases were reported by Benzerara et al. (2022) (3) i.e. strains harboring *ccyA* but in which iACC was not detected in laboratory cultures. These false positives are two axenic *Microcystis* PCC strains (*M. aeruginosa* PCC 9432 and PCC 9717, belonging to the genotypic groups Mae1 and Mae3_3, respectively). It was proposed that the tested culture conditions might not always promote iACC formation within these strains or that one or more of the other to-be-identified genes involved in the biomineralization process might be missing. Therefore, the proportion of 93 genomes with *ccyA* out of 282 good-quality genomes ($\approx 1/3$) should be considered as an overestimated proportion of iACC-forming strains. Future systematic microscopy analyses of strains with sequenced genomes may allow refining this ratio.

The iACC inclusions are not only detected in cultures but also in samples from five freshwater lakes. This illustrates that iACC biomineralization is not restricted to laboratory conditions but also occurs under environmental conditions. Multiple reasons may explain why this common feature has been overlooked in the past: (i) a strong or total loss of iACC has been reported upon several sample preparation protocols, including those involving the use of chemical fixatives, such as in standard ultramicrotomy (9,38); (ii) cells degrade rapidly under the electron beam, which complicates the imaging of iACC inclusions, especially when they are relatively small; (iii) iACC inclusions can be confused with other types of inclusions such as PolyP, which therefore requires to conduct spatially resolved chemical analyses (e.g., by SEM- or STEM-EDXS). Electron microscopy analyses can be fastidious to conduct on multiple samples and do not easily provide a statistically accurate assessment of the proportion of iACC-forming *Microcystis* cells in a population where both *ccyA*- and *ccyA*+ are present, such as in Champs-sur- ne. However, this assessment may be more straightforward

by genomic approaches in populations where mostly *ccyA*+ genomes are detected. In the future, the use of bulk analyses such as Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, sensitive enough to iACC within cyanobacterial cells may help to more rapidly screen large amounts of samples as recently shown by Mehta *et al.* (2022) (39).

5.2 Potential impacts on the Ca geochemical cycle

Some geochemical implications of the evidenced prevalence of iACC biomineralization by *Microcystis* can be explored. Recent studies (5,7) assessed that iACC+ cyanobacteria (based on analyses of several genera but *Microcystis*) may contain from ~10 to 185 mg of Ca per g of dry matter. The dry biomass of *Microcystis* blooms can reach up to 3,5 mg.L⁻¹ (40). Assuming that the Ca amounts per cell previously estimated can be applied to *Microcystis*, the Ca content of the cells during a bloom event would be equivalent to a Ca concentration from 0.87 μM to 16.2 μM if all Ca from iACC was released to the extracellular solution in the depth band where the aforementioned cell density is achieved. This is significant when compared to the range (10 μM and 1800 μM) of dissolved Ca concentrations in continental aqueous environments (41). Overall, this shows that iACC within *Microcystis* may represent a significant reservoir of the Ca geochemical cycle in lakes during blooms. Similarly, based on the same numbers, iACC in a *Microcystis* bloom may be equivalent to 0.87 μM to 16.2 μM of inorganic carbon. This may appear more modest compared to the ~0.15 μM to 7 mM range of dissolved inorganic carbon detected in continental aqueous environments (41). However, there are strong diurnal fluctuations due photosynthetic uptake, and high temperatures might lower the concentrations due to the lower solubility of CO₂ and overall, future studies should be conducted to better assess the potential importance of iACC as an inorganic carbon reservoir.

Moreover, De Wever *et al.* (2019) (5) showed a better growth of some iACC+ cyanobacteria at higher Ca concentrations. However, this was not the case for all iACC+ cyanobacteria and we do not currently know if this is the case for *Microcystis* strains. Yet, if this is true for *Microcystis* as well, a negative feedback loop may occur: the onset of massive iACC+ *Microcystis* blooms may result in a decrease of extracellular dissolved Ca concentrations. This decrease may subsequently induce a limitation of iACC+ *Microcystis* growth. Interestingly, the role of Ca in *Microcystis* ecology has been already mentioned in the past, since it has been suggested that high concentrations of Ca (> 2.5 mM) may promote the formation of blooms (42,43). Here, we speculate that Ca has an additional role, i.e. feeding the formation of iACC, at least for some *Microcystis* genotypes/phenotypes biomineralizing iACC.

5.3 Phylogenetic distribution of *ccyA*

In the present study, our phylogenomic analysis has found most of the 22 genotypic groups defined by Pérez-Carrascal *et al.* (2019) (36) and modified by Dick *et al.* (2021) (37). However, it is important to note that some nodes remain poorly supported (bootstrap values below 60%), which nuances the relative positioning of these clusters. The *ccyA* gene is found

in 12 different genotypic groups (Mwe, Mn, Mae 4, Mae 5, Mae 6, Mae 8 to 10, Mfl ae 2 to 4, and Mae3 2), showing that *ccyA*, and thus potentially the ability to form iACC, is widespread within the *Microcystis* genus. The number of available genomes belonging to those genotypic groups widely differs. For example, the Mae2_(HL/LG) group has an especially large number of representative genomes, which might be due to a greater sampling effort. Because of the heterogeneous distribution of *ccyA* among genotypic groups, the biased sampling of these groups may directly induce a bias in the proportion of *ccyA*+/*ccyA*- genomes.

Genomes containing the *ccyA* gene distribute as relatively large clusters in the phylogenetic tree of *Microcystis*. In particular, several clusters stretch over most of the top part of the tree shown in Figure 2.6, extending from *Microcystis aeruginosa* LG13-11 to PMC 730, with most genomes possessing the *ccyA* gene. Few other clusters span the rest of the tree, dispersed in between genomes not possessing the gene. As previously suggested by Benzerara et al. (2022) (3), the distribution of *ccyA* in the cyanobacteria phylogenetic tree was best explained by vertical transfers of *ccyA* from an ancient ancestor to modern cyanobacteria with multiple independent losses. Assuming that this is also true at the scale of the *Microcystis* genus, one can explain the distribution of *ccyA* in the “top” part of the tree by at most 10 gene loss events, this estimation being probably overestimated due to the weak support of some of these nodes. Consistently, loss events have been shown to be frequent in *Microcystis* (44,45). Moreover, families of genes that were shown to contract over evolutionary time scales were enriched, notably in the function of “inorganic ion transport and metabolism” (45). The “bottom” part of the tree with few *ccyA* occurrences can be most parsimoniously explained by one ancient loss of *ccyA* followed by few secondary (re)gains by horizontal gene transfers (HGT) (*e.g.* for the Mae 3_3 group). HGT is recurrently described as a frequent process in *Microcystis* genus (45–47), which may support this explanation.

5.4 *Microcystis* within-population diversity based on *ccyA* presence/absence

Overall, *ccyA* appears as an accessory gene in *Microcystis*, since it is present in 93 out of 282 good-quality genomes. Therefore, it adds to the striking diversity of dispensable genes (*i.e.* accessory genes and unique genes) found in the highly plastic genome of *Microcystis* (45,46,48), that are involved in various functions such as replication, recombination, repair, signal transduction, and transcription (48), or the extensively studied function of toxin production (49). However, a significant part of the accessory genes, such as *ccyA*, lacks functional annotation. It has been advocated that this open pangenome and the strain-level genomic diversity could have a key role in the ecological success of *Microcystis*, by offering an efficient strategy to quickly adapt to a fluctuating environment, with the dominance of certain phenotypes within a mixed population or under local conditions (37,50). Based on these general considerations, the *ccyA* gene may provide some ecological success under some particular environmental conditions that remain to be determined. Whether these

conditions may be related with calcium and/or inorganic carbon availability and whether this availability might fluctuate over time remains to be studied. One way to assess these conditions may consist in determining the relationship between genotypic diversity and environmental conditions. We identified four geographic groups large enough so that the within-population micro-diversity of *Microcystis* can be assessed. Three were dominated by either *ccyA*⁺ (one from Lake Pampulha) or *ccyA*⁻ (two from Lake Champlain) genomes. By contrast, the Champs-Sur-Marne geographic group contained both *ccyA*⁺ and *ccyA*⁻ genomes at the same time during a bloom. The *ccyA*⁺ strains in the Pampulha dataset affiliated with one genetic cluster only, suggesting some possible dominance of the bloom population by one *ccyA*⁺ clone. In Champs-sur- ne, *ccyA*⁺ strains affiliated with 2 different genotypic groups. Overall, these particular distributions of *ccyA* within *Microcystis* populations suggest that some yet-to-identify biotic and abiotic parameters of the ecosystems may favor the dominance or absence of iACC-forming strains in environments such as Lake Pampulha or Lake Champlain. Yet, based on this assumption, the presence of both *ccyA* +/- genotypes at the same date, co-existing spatially in ecosystems such as in Champs sur ne is more intriguing. It is important to consider that, unlike the Lake Pampulha and Lake Champlain groups, the genomes retrieved from Champs sur ne were obtained from cultures, and this could influence the *ccyA*⁺/*ccyA*⁻ ratio of this group. Indeed, assessing genotypic diversity in an environment using cultivation-based samples is difficult, since strains better adapted to the high concentration of nutrients typically found in culture media compared with the environmental conditions are preferentially selected (49). Alternatively, such a genotypic diversity in a single population may really occur similarly to what was evidenced before (51,52). Among other possible explanations, the existence of some local variable ecological niches was suggested. Alternatively, one may hypothesize a temporal dynamic of *ccyA*⁺ genotypes paralleling the bloom dynamics. These dynamics are associated with strong variations of, e.g., pH, N, P, and pCO₂ concentrations, which are parameters known to favor the emergence of specific genotypes and shifts within *Microcystis* populations (36,43). At some moments, when shifts take place, one may expect mixtures of different genotypes.

The *ccyA* gene is highly conserved among the *Microcystis* genus ($\geq 72.6\%$ identity). If it has not been horizontally transferred recurrently among the different *Microcystis* lineages, this suggests that there is a strong selective pressure, and thus some functional importance of calcyanin for the cell. So far, some potential functions have been speculated for iACC, including intracellular pH buffering, a reserve of inorganic carbon, or a ballast (53). How such functions may relate to environmental parameters such as dissolved Ca concentrations, variability of the inorganic C availability, and/or pH variations are not clear. Unfortunately, those parameters are not routinely monitored. Future temporal studies will help to pinpoint and explore further the correlations between these abiotic parameters and the co-dominance of *ccyA*⁺ or *ccyA*⁻ genotypes in *Microcystis* populations. Moreover, it can be hypothesized that iACC formation is related with carbon concentrating mechanisms (CCM), which have been abundantly described in cyanobacteria (e.g., 54). However, this currently

remains an uncharted topic and future studies may dwell on the present one to test if some genes involved in CCM might be differentially expressed in *ccyA*⁺ or *ccyA*⁻ strains. Similarly, although first quick observations do not suggest it, the existence of a potential correlation between strain toxicity and iACC formation should be tested in the future. Last, genetic studies may help to unravel if the deletion of the *ccyA* gene may have some additional effect on cells than formation of iACC only.

6 Conclusions

Overall, our study shows that the biomineralization of iACC is a common trait in *Microcystis*, under laboratory conditions as well as under environmental conditions. The correlation between the capability to form iACC and the presence of the *ccyA* gene as suggested by Benzerara et al. (2022) (3) is further supported by combined electron microscopy and genomic analyses of 24 newly sequenced *Microcystis* genomes. This marker gene is an accessory gene in the *Microcystis* pangenome. Its quasi-binary distribution (i.e., either all *ccyA*⁺ or *ccyA*⁻) in some extensive datasets suggests that some not-yet-identified environmental parameters may favor *ccyA*⁺ or *ccyA*⁻ genotypes. Blooming populations of *ccyA*⁺ *Microcystis* may significantly impact the geochemical cycle of Ca, a hypothesis that will be further tested in future studies.

7 Acknowledgments

We thank Baptiste Ancieaux, Fabien Franc and Mehdi Mokhtari from the Île de Loisirs of Cergy and Jeton Maksutaj and Pierre Wunen-Burger from the Nautical centre Val-de-Seine for their help. We thank Imène Estève, Béatrice Doisneau and Stéphanie Delbrel from the SEM platform at IMPMC, as well as Jean-Michel Guigner from the IMPMC TEM platform.

8 Data availability statement

Materials described in the manuscript will be freely available upon publication of the manuscript to any researcher wishing to use them for non-commercial purposes. Genomes of the 26 PMC strains have been deposited in NCBI (BioProject ID: PRJNA888979). All other datasets generated and/or analysed during the current study (SEM/TEM) are available on the recherche.data.gouv.fr repository (doi: 10.57745/WGOJL7).

9 Bibliographie du chapitre 2

1. Monteil CL, Benzerara K, Menguy N, Bidaud C, Michot-Achdjian E, Bolzoni R, *et al.* Intracellular amorphous Ca-carbonate and magnetite biomineralization by a magnetotactic bacterium affiliated to the Alphaproteobacteria. *ISME J.* 2021;15(1):1–18.
2. Benzerara K, Bolzoni R, Monteil C, Beyssac O, Forni O, Alonso B, *et al.* The gammaproteobacterium *Achromatium* forms intracellular amorphous calcium carbonate and not (crystalline) calcite. *Geobiology.* 2021;19(2):199–213.
3. Benzerara K, Duprat E, Bitard-Feildel T, Caumes G, Cassier-Chauvat C, Chauvat F, *et al.* A New Gene Family Diagnostic for Intracellular Biomineralization of Amorphous Ca Carbonates by Cyanobacteria. Dagan T, editor. *Genome Biol Evol.* 2022;14(3):evac026.

4. Gray N, Head I. The Family Achromatiaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014;p.1–14.
5. Wever AD, Benzerara K, Coutaud M, Caumes G, Poinso M, Skouri-Panet F, *et al*. Evidence of high Ca uptake by cyanobacteria forming intracellular CaCO₃ and impact on their growth. *Geobiology*. 2019;17(6):676–90.
6. Ragon M, Benzerara K, Moreira D, Tavera R, Lopez-Garcia P. 16S rDNA-based analysis reveals cosmopolitan occurrence but limited diversity of two cyanobacterial lineages with contrasted patterns of intracellular carbonate mineralization. *Front Microbiol*. 2014;5.
7. Cam N, Benzerara K, Georgelin T, Jaber M, Lambert JF, Poinso M, *et al*. Cyanobacterial formation of intracellular Ca-carbonates in undersaturated solutions. *Geobiology*. 2018;16(1):49–61.
8. Blondeau M, Sachse M, Boulogne C, Gillet C, Guigner JM, Skouri-Panet F, *et al*. Amorphous Calcium Carbonate Granules Form Within an Intracellular Compartment in Calcifying Cyanobacteria. *Front Microbiol*. 2018;9:1768.
9. Li J, garet Oliver I, Cam N, Boudier T, Blondeau M, Leroy E, *et al*. Biomineralization Patterns of Intracellular Carbonatogenesis in Cyanobacteria: Molecular Hypotheses. *Minerals*. 2016;6(1):10.
10. Couradeau E, Benzerara K, Gérard E, Moreira D, Bernard S, Brown GE, *et al*. An Early-Branching Microbialite Cyanobacterium Forms Intracellular Carbonates. *Science*. 2012;27;336(6080):459–62.
11. Görgen S, Benzerara K, Skouri-Panet F, Gugger M, Chauvat F, Cassier-Chauvat C. The diversity of molecular mechanisms of carbonate biomineralization by bacteria. *Discov Mater*. 2021;1(1):2.
12. Harke MJ, Steffen MM, Gobler CJ, Otten TG, Wilhelm SW, Wood SA, *et al*. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae*. 2016;54:4–20.
13. Saxton MA, Arnold RJ, Bourbonniere RA, McKay RML, Wilhelm SW. Plasticity of Total and Intracellular Phosphorus Quotas in *Microcystis aeruginosa* Cultures and Lake Erie Algal Assemblages. *Front Microbiol*. 2012;3.
14. Wang Y, Wu M, Yu J, Zhang J, Zhang R, Zhang L, *et al*. Differences in growth, pigment composition and photosynthetic rates of two phenotypes *Microcystis aeruginosa* strains under high and low iron conditions. *Biochem Syst Ecol*. 2014;55:112–7.
15. Reynolds CS, Jaworski GHM, Cmiech HA, Leedale GF, Lund JWG. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis Aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1981;293(1068):419–77.
16. Thomas RH, Walsby AE. Buoyancy Regulation in a Strain of *Microcystis*. *Microbiology*. 1985;131(4):799–809.
17. Gobler CJ, Burkholder JM, Davis TW, Harke MJ, Johengen T, Stow CA, *et al*. The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*. 2016;54:87–97.
18. Catherine A, Mouillot D, Escoffier N, Bernard C, Troussellier M. Cost effective prediction of the eutrophication status of lakes and reservoirs. *Freshw Biol*. 2010;55(11):2425–35.
19. Ledreux A, Thomazeau S, Catherine A, Duval C, Yéprémian C, Marie A, *et al*. Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. *Harmful Algae*. 2010;10(1):88–97.
20. Louati I, Pascault N, Debroas D, Bernard C, Humbert JF, Leloup J. Structural Diversity of Bacterial Communities Associated with Bloom-Forming Freshwater Cyanobacteria Differs According to the Cyanobacterial Genus. *PLOS ONE*. 2015;10(11):e0140614.
21. Sotton B, Paris A, Le Manach S, Blond A, Duval C, Qiao Q, *et al*. Specificity of the metabolic signatures of fish from cyanobacteria rich lakes. *Chemosphere*. 2019;226:183–91.
22. Vieira-Lanero R, Barca S, Cobo MC, Cobo F. Occurrence of Freshwater Cyanobacteria and Bloom Records in Spanish Reservoirs (1981–2017). *Hydrobiology*. 2022;1;1(1):122–36.
23. Kotai J. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. 1972.
24. Benzerara K, Skouri-Panet F, Li J, Ferard C, Gugger M, Laurent T, *et al*. Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(30):10933–8.
25. Halary S, Duval C, Gallet A, Duperron S, Piquet B, Demay J, *et al*. Draft Genome Sequence of the Toxic Freshwater *Microcystis aeruginosa* Strain PMC 728.11 (Cyanobacteria, Chroococcales). *Microbiol Resour Announc*. 2020;9(48):e01096-20.
26. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, *et al*. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455–77.
27. Lin HH, Liao YC. Accurate binning of metagenomic contigs via automated clustering sequences using information of genomic signatures and marker genes. *Sci Rep*. 2016;6(1):24175.
28. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9(4):357–9.

29. von Meijenfeldt FAB, Arkhipova K, Cambuy DD, Coutinho FH, Dutilh BE. Robust taxonomic classification of uncharted microbial sequences and bins with CAT and BAT. *Genome Biol.* 2019;20(1):217.
30. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 2015;25(7):1043–55.
31. Tuller T, Felder Y, Kupiec M. Discovering local patterns of co - evolution: computational aspects and biological examples. *BMC Bioinformatics.* 2010;11(1):43.
32. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, *et al.* Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 2015;31(22):3691–3.
33. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol.* 2013;30(4):772–80.
34. Stamatakis A, Aberer AJ, Goll C, Smith SA, Berger SA, Izquierdo-Carrasco F. RAXML-Light: a tool for computing terabyte phylogenies. *Bioinformatics.* 2012;28(15):2064–6.
35. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W293–6.
36. Pérez-Carrascal OM, Terrat Y, Giani A, Fortin N, Greer CW, Tromas N, *et al.* Coherence of *Microcystis* species revealed through population genomics. *ISME J.* 2019;13(12):2887–900.
37. Dick GJ, Duhaime MB, Evans JT, Errera RM, Godwin CM, Kharbush JJ, *et al.* The genetic and ecophysiological diversity of *Microcystis*. *Environ Microbiol.* 2022;23(12):7278-7313.
38. Blondeau M, Sachse M, Boulogne C, Gillet C, Guigner JM, Skouri-Panet F, *et al.* Amorphous Calcium Carbonate Granules Form Within an Intracellular Compartment in Calcifying Cyanobacteria. *Front Microbiol.* 2018;9.
39. Mehta N, Gaëtan J, Giura P, Azaïs T, Benzerara K. Detection of biogenic amorphous calcium carbonate (ACC) formed by bacteria using FTIR spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2022;121262.
40. Horst GP, Sarnelle O, White JD, Hamilton SK, Kaul RB, Bressie JD. Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Water Res.* 2014;54:188–98.
41. Weyhenmeyer GA, Hartmann J, Hessen DO, Kopáček J, Hejzlar J, Jacquet S, *et al.* Widespread diminishing anthropogenic effects on calcium in freshwaters. *Sci Rep.* 2019;9(1):10450.
42. Chen H, Lüring M. Calcium promotes formation of large colonies of the cyanobacterium *Microcystis* by enhancing cell-adhesion. *Harmful Algae.* 2020;92:101768.
43. Gu P, Li Q, Zhang W, Zheng Z, Luo X. Effects of different metal ions (Ca, Cu, Pb, Cd) on formation of cyanobacterial blooms. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;189:109976.
44. Yancey CE, Smith DJ, Den Uyl PA, Mohamed OG, Yu F, Ruberg SA, *et al.* Metagenomic and Metatranscriptomic Insights into Population Diversity of *Microcystis* Blooms: Spatial and Temporal Dynamics of mcy Genotypes, Including a Partial Operon That Can Be Abundant and Expressed. Rudi K, editor. *Appl Environ Microbiol.* 2022;e02464-21.
45. Cao H. Comprehensive and functional analyses reveal the genomic diversity and potential toxicity of *Microcystis*. *Harmful Algae.* 2022;11.
46. Humbert JF, Barbe V, Latifi A, Gugger M, Calteau A, Coursin T, *et al.* A Tribute to Disorder in the Genome of the Bloom-Forming Freshwater Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *PLOS ONE.* 2013;8(8):e70747.
47. Tanabe Y, Hodoki Y, Sano T, Tada K, Watanabe MM. Adaptation of the Freshwater Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to Brackish Water Is Driven by Recent Horizontal Transfer of Sucrose Genes. *Front Microbiol.* 2018;9.
48. Chen M, Xu CY, Wang X, Ren CY, Ding J, Li L. Comparative genomics analysis of c-di-GMP metabolism and regulation in *Microcystis aeruginosa*. *BMC Genomics.* 2020;21(1):217.
49. Humbert JF, Barbe V, Latifi A, Gugger M, Calteau A, Coursin T, *et al.* A Tribute to Disorder in the Genome of the Bloom-Forming Freshwater Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *PLOS ONE.* 2013;8(8):e70747.
50. Meyer KA, Davis TW, Watson SB, Deneff VJ, Berry MA, Dick GJ. Genome sequences of lower Great Lakes *Microcystis* sp. reveal strain-specific genes that are present and expressed in western Lake Erie blooms. Humbert JF, editor. *PLOS ONE.* 2017;12(10):e0183859.
51. Kurmayer R, Christiansen G, Chorus I. The Abundance of Microcystin-Producing Genotypes Correlates Positively with Colony Size in *Microcystis* sp. and Determines Its Microcystin Net Production in Lake Wannsee. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(2):787–95.

52. Wang X, Sun M, Xie M, Liu M, Luo L, Li P, *et al.* Differences in microcystin production and genotype composition among *Microcystis* colonies of different sizes in Lake Taihu. *Water Res.* 2013;47(15):5659–69.
53. Cosmidis J, Benzerara K. Why do microbes make minerals? *Comptes Rendus Géoscience.* 2022;354(G1):1–39.
54. Badger MR, Price GD. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* 2003;54 (383): 609-622.
55. Harke MJ, Davis TW, Watson SB, Gobler CJ. Nutrient-Controlled Niche Differentiation of Western Lake Erie Cyanobacterial Populations Revealed via Metatranscriptomic Surveys. *Environ Sci Technol.* 2016 Jan 19;50(2):604–15.
56. Rinta-Kanto JM, Ouellette AJA, Boyer GL, Twiss MR, Bridgeman TB, Wilhelm SW. Quantification of Toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 Blooms in Western Lake Erie using Quantitative Real-Time PCR. *Environ Sci Technol.* 2005 1;39(11):4198–205.
58. Cam N, Georgelin T, Jaber M, Lambert JF, Benzerara K. In vitro synthesis of amorphous Mg-, Ca-, Sr- and Ba-carbonates: What do we learn about intracellular calcification by cyanobacteria? *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 2015 161:36–49.
59. Gaëtan J, Halary S, Millet M, Bernard C, Duval C, Hamlaoui S, *et al.* Widespread formation of intracellular calcium carbonates by the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis* . *Environmental Microbiology.* 2022 1462-2920.16322.

Chapitre 3 : Suivi temporel de
Microcystis dans deux étangs d'Ile-de-
France

De nombreuses études ont montré que la température et la disponibilité en N et P jouaient un rôle majeur dans l'apparition d'efflorescences de cyanobactéries, notamment du genre *Microcystis* (1–4). Malgré de nombreux travaux, il est encore difficile de prédire et de comprendre la dynamique et l'émergence de ces efflorescences. Dans le premier chapitre de la thèse, nous avons montré que la biominéralisation d'iACC était un phénomène répandu au sein du genre *Microcystis*, à la fois par des observations en microscopie dans différents plans d'eau, mais également par des approches bio-informatiques à plus grande échelle. Nous avons notamment déterminé que jusqu'à 1/3 des souches de *Microcystis* dont le génome a été séquencé possèdent le gène *ccyA*. Au laboratoire, certaines cyanobactéries iACC+ ont tendance à séquestrer massivement le Ca et peuvent donc, dans certaines conditions, diminuer la concentration de Ca²⁺ extracellulaire (5). De plus, leur croissance peut être limitée lorsque la concentration initiale en Ca²⁺ dissous est faible, ce qui n'est pas le cas pour les cyanobactéries ne formant pas d'iACC. Ainsi, le Ca pourrait être un paramètre modulant la croissance des souches iACC+ de *Microcystis* et leur succès écologique, en contribuant à une meilleure fitness (*i.e.* valeur sélective). Ainsi, la disponibilité de cet élément chimique pourrait avoir une influence sur la diversité intra-espèce (proportion de souches iACC+ vs. iACC-) et leur dynamique temporelle (efflorescence). En retour, *Microcystis* pourrait être un acteur majeur dans la séquestration du Ca au sein d'un écosystème aquatique.

Pour étudier ces hypothèses, une étude *in situ*, couplant écologie microbienne, minéralogie et géochimie, a été réalisée entre juin et octobre 2021, sur deux lacs de la région parisienne : le site de Cergy-Pontoise (base de loisirs) et celui de Verneuil-sur-Seine (base nautique). Ces deux sites ont été choisis car ils sont régulièrement soumis à des efflorescences, parfois dominées par *Microcystis*. De plus, leur proximité géographique permet d'avoir une météorologie similaire, un suivi visuel de la qualité des eaux, et un accès facilité aux sites. Un échantillonnage quasi hebdomadaire (10 dates) entre fin juin et fin octobre 2021, a été réalisé, et les compartiments biologiques et chimiques ont été analysés afin d'estimer l'importance et l'évolution du réservoir de Ca, avec le poids potentiel des efflorescences de *Microcystis*. La capacité à former des iACC au sein d'une communauté naturelle de *Microcystis* a été déterminée en combinant des techniques de microscopie électronique (MEB-EDXS et STEM-HAADF-EDXS) ainsi que des techniques de spectroscopie (FTIR, XANES). Nous avons observé la présence de cellules de *Microcystis* formant des iACC à 7 dates sur 10, pour les deux sites. Cependant, les inclusions d'iACC étaient présentes en quantité trop faible pour être détectées par les techniques de spectroscopie (FTIR, XANES). Cela suggère que les iACC constituaient un réservoir de Ca peu important en masse à cette période. En parallèle, la dynamique temporelle des populations iACC+ de *Microcystis* a été déterminée en suivant l'abondance du gène *ccyA* par des outils de biologie moléculaire. La population *ccyA+* était présente à toutes les dates, et lorsque l'abondance totale des *Microcystis* augmentait, la population *ccyA-* dominait, et l'abondance des transcrits de *ccyA* était sous la limite de détection.

En parallèle, vingt-cinq souches ont été isolées, dont 2 provenant du site de Verneuil et 22 du site de Cergy. Après un criblage moléculaire (qPCR et RT-qPCR), les génomes des souches *ccyA*⁺ et *ccyA*⁻ ont été séquencés avec la méthodologie NovaSeq à haute couverture pour accéder à une reconstruction complète du génome (. Une partie des souches a été observée en microscopie électronique à balayage (MEB-EDXS), et les résultats préliminaires sont synthétisés dans le tableau III.I. Ainsi, on retrouve ici une diversité de souches comparable à celle observée dans le chapitre 1 (qui portait sur le site de Champs-Sur-Marne) : pour le site de Cergy, certaines souches possèdent le gène *ccyA* et forment des iACC, tandis que d'autres ne le possèdent pas et n'en forment pas. Pour certaines souches, nous avons détecté la présence du gène *ccyA* et son expression, sans observer d'iACC. On notera également que l'expression du gène *ccyA* est détectée dans ces cultures, alors que les transcrits n'étaient pas détectables sur le terrain à Cergy et Verneuil, appuyant l'hypothèse que la limite de détection de nos outils ne permettait pas de détecter un signal. Par la suite, les génomes seront analysés pour explorer les gènes voisins et les synténies/clusters conservés autour du gène *ccyA*.

Ce projet s'inscrit dans un projet en collaboration entre l'IMPMC (Karim Benzerara, Fériel Skouri-Panet et Neha Mehta), l'iEES (Julie Leloup et Amandine Hecquet) et le MCAM (Benjamin Marie, Sébastien Halary et Charlotte Duval, MNHN). L'échantillonnage a été réalisé en collaboration avec Amandine Hecquet, Fériel Skourit-Panet, Karim Benzerara et Julie Leloup. Les analyses de biologie moléculaire ont été réalisées par Amandine Hecquet sous la direction de Julie Leloup. L'isolation et la culture des souches a été réalisée par Charlotte Duval, et la reconstruction et l'analyse des génomes sera réalisée par Sébastien Halary. L'acquisition des spectres XANES a été réalisée en collaboration avec Delphine Vantlon (Synchrotron Soleil), Karim Benzerara et Neha Mehta (IMPMC), l'analyse des spectres a été réalisée par Neha Mehta en collaboration avec Delphine Vantlon et Alejandro Fernandez-Martinez (Université Grenoble I). Enfin, l'analyse de la composition chimique du particulaire (ternaires) a été réalisée par Karim Benzerara.

Tableau III.I. Résultats préliminaire du criblage de la présence d'iACC (MEB-EDXS) et de la présence et de l'expression du gène *ccyA* (qpCR et RT-qPCR) des souches isolées à Verneuil et Cergy. ND = analyses non réalisées.

N° PMC	Site	Date isolement	Présence d'iACC	Détection gène <i>ccyA</i>	Expression gène <i>ccyA</i>
1351.22	Verneuil	29.09.22	Non	Oui	Oui
1352.22	Verneuil	29.09.22	Oui	Oui	Oui
1352.22	Verneuil	29.09.22	Oui	Oui	Oui
1354.22	Cergy	15.09.22	Non	Non	Non
1355.22	Cergy	15.09.22	Non	Non	Non
1356.22	Cergy	15.09.22	Non	Non	Non
1357.22	Cergy	15.09.22	Non	Non	Non
1358.22	Cergy	15.09.22	Oui	Oui	Oui
1359.22	Cergy	15.09.22	Non	Non	Non
1360.22	Cergy	15.09.22	Non	Non	Non
1361.22	Cergy	15.09.22	Oui	Oui	Oui
1362.22	Cergy	15.09.22	ND	Non	Non
1363.22	Cergy	15.09.22	ND	Non	Non
1364.22	Cergy	29.09.22	Non	Oui	Oui
1365.22	Cergy	29.09.22	ND	Non	Non
1366.22	Cergy	29.09.22	Peut-être	Oui	Oui
1367.22	Cergy	29.09.22	ND	Non	Non
1368.22	Cergy	29.09.22	ND	Non	Non
1369.22	Cergy	29.09.22	Oui	Oui	Oui
1370.22	Cergy	29.09.22	ND	Non	Non
1371.22	Cergy	29.09.22	ND	Non	Non
1372.22	Cergy	29.09.22	ND	Non	Non
1373.22	Cergy	29.09.22	ND	Non	Non
1374.22	Cergy	29.09.22	ND	Non	Non
1375.22	Cergy	29.09.22	ND	Non	Non

1 Introduction

Microcystis est une cyanobactérie fréquemment impliquée dans des efflorescences toxiques, avec de fortes conséquences environnementales (6,7). Il a récemment été mis en évidence que *Microcystis*, à l'instar de nombreuses autres cyanobactéries, est capable de former des carbonates de calcium intracellulaires amorphes (iACC) (8,9). Bien qu'une large diversité phylogénétique de bactéries soient capables de former ces inclusions de carbonates, les mécanismes moléculaires et le rôle des inclusions dans le métabolisme bactérien restent encore peu explorés. Cependant, des recherches ont démontré qu'en conditions de laboratoire, certaines cyanobactéries formant des iACC incorporent plus de calcium dissous que d'autres, réduisant ainsi considérablement la concentration extracellulaire de calcium dans leur milieu de culture (5,10). Une approche de génomique comparative a également mis en évidence un gène orphelin dont la présence est corrélée avec la formation d'iACC. Ce gène, *ccyA*, peut servir de gène marqueur du processus de biominéralisation d'iACC chez les cyanobactéries (8,9). Jusqu'à aujourd'hui, la plupart des études menées sur la formation des iACC ont porté principalement sur des souches en culture (5,8,10–12), mise à part celle de Ragon et al. (2014) (13) qui a montré que les cyanobactéries formant des iACC peuvent être peu abondantes dans certains environnements, notamment hydrothermaux.

Chez *Microcystis*, la formation d'iACC été observée dans des cultures au laboratoire ainsi que dans des échantillons environnementaux (9). Des cellules formant des iACC ont en effet été détectées dans 5 plans d'eau d'Ile de France et en Espagne. Nous avons également observé qu'au sein d'une même population de *Microcystis*, il existe une certaine diversité phénotypique au regard de la formation d'iACC. De plus, en se basant sur le gène marqueur, nous avons mis en évidence que le ratio de souches *ccyA*+/*ccyA*- variait drastiquement selon les environnements, allant de 0 à presque 100 % d'une population. En se basant sur (i) les études de Cam et al. 2018 (10) et de De Wever et al. 2019 (5) qui ont estimé que certaines cyanobactéries iACC+ contiennent entre 10 et 185 mg de Ca par g de matière sèche et (ii) le fait que la biomasse de *Microcystis* lors d'efflorescences peut atteindre 3,5 mg.L⁻¹ (14), on déduit que le contenu en calcium dans les efflorescences pourrait être l'équivalent d'une concentration en Ca entre 0,87 et 16,2 µM, (en appliquant l'estimation de teneur cellulaire en Ca faite sur d'autres cyanobactéries à *Microcystis*) (9). En comparaison avec les concentrations en calcium moyennes des environnements d'eau douce continentales, qui varient entre 10 et 1800 µM (15), ce réservoir de Ca peut donc être non négligeable en taille. Par ailleurs, il a été montré que le calcium jouait un rôle dans l'écologie de cette cyanobactérie : de fortes concentrations en Ca (>2,5 mM) peuvent promouvoir la formation d'efflorescences (16–18). Dans le cas de la formation des iACC, cet élément pourrait jouer un rôle additionnel dans l'écologie des souches de *Microcystis*, en impactant la formation de ces inclusions notamment.

Dans ce chapitre, nous explorons l’hypothèse que le processus de formation de carbonates de calcium intracellulaires (iACC) pourrait avoir un impact significatif sur la géochimie de ces environnements. Plus particulièrement, il s’agit de (i) déterminer si l’on peut quantifier la taille du réservoir iACC dans le cycle du Ca et (ii) estimer son importance relative vis-à-vis d’autres réservoirs de Ca. A l’inverse, de potentielles variations géochimiques de l’environnement pourraient influencer la biominéralisation intracellulaire. Pour explorer ces hypothèses, nous avons couplé écologie microbienne, minéralogie et géochimie afin de caractériser géochimiquement deux environnements lacustres régulièrement soumis à des efflorescences, et d’étudier la dynamique des populations de *Microcystis* vis-à-vis de la formation d’iACC. Ainsi, cette étude se rapproche et se distingue de nombreuses études précédentes qui se sont intéressées à la dynamique des populations de *Microcystis* en fonction des paramètres physico-chimiques, mais avec le souci principal d’évaluer un lien avec la production de toxines (14,19–22).

Dans un premier temps, nous avons documenté précisément les paramètres physico-chimiques, ainsi que les concentrations élémentaires dans les fractions particulaires et dissoutes (voir figure 3.1). En couplant des techniques de microscopies électroniques ainsi que des techniques de caractérisation spectroscopique (FTIR, XANES), nous avons tenté de préciser la spéciation du Ca dans la phase particulaire. En effet, malgré l’importance de cette démarche pour préciser le cycle du calcium notamment, l’analyse fine des paramètres physico-chimiques environnementaux lors des efflorescences à *Microcystis* reste rare, en dehors des paramètres classiques tel que les nutriments comme le P et le N (7,22,23). Cette analyse nous a permis de caractériser différents réservoirs de calcium et leur dynamique, afin d’évaluer l’importance du réservoir de Ca que peuvent constituer les ACC formés par *Microcystis* dans l’environnement. Enfin, nous avons étudié en parallèle la dynamique des

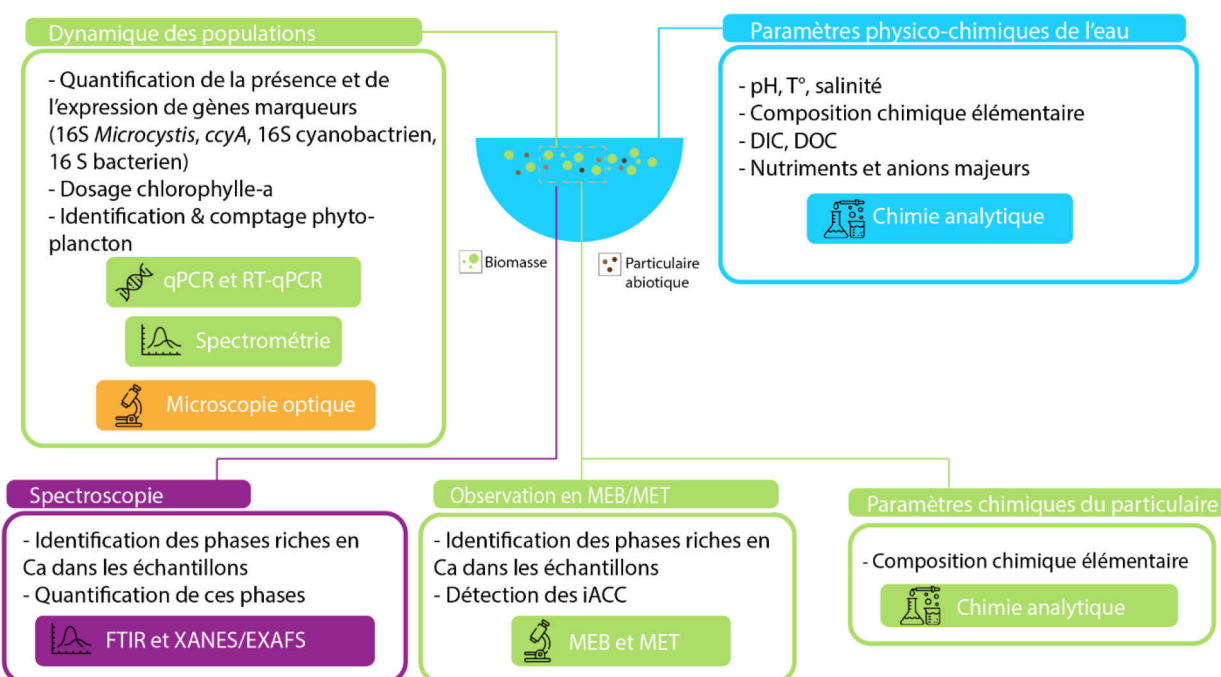


Figure 3.1 Stratégie de l’étude de terrain menée entre juin et octobre 2021 sur deux lacs de région parisienne

populations de *Microcystis* susceptibles de former des iACC à l'aide de la quantification du gène marqueur *ccyA* (voir figure 3.1).

2 Matériels et Méthodes

2.1 Sites d'études

Deux sites d'études ont été suivis : (i) l'étang des Galets (base de loisirs de Cergy-Pontoise, 49°01'33.1"N 2°02'56.1"E) (Figure 3.2C) et (ii) l'étang de la Grosse Pierre (base nautique de Verneuil-sur-Seine, 48°59'28.7"N 1°58'15.4"E) (Figure 3.2B). Ces étangs peu profonds sont connus pour avoir subi des épisodes récurrents d'efflorescences de cyanobactéries, y compris de *Microcystis*, au cours des dernières années (24,25). Ces sites sont d'anciennes carrières de sédiments alluviaux et de sable, qui ont été inondées entre les années 1940 et 1980. L'étang des Galets (site de Cergy) fait maintenant partie d'un complexe de base de loisir, mais il n'est pas utilisé pour la baignade ou les activités nautiques. Celui de la Grosse Pierre (site de Verneuil) est utilisé exclusivement pour les activités de la base nautique de Verneuil-Sur-Seine en saison estivale (printemps-automne).

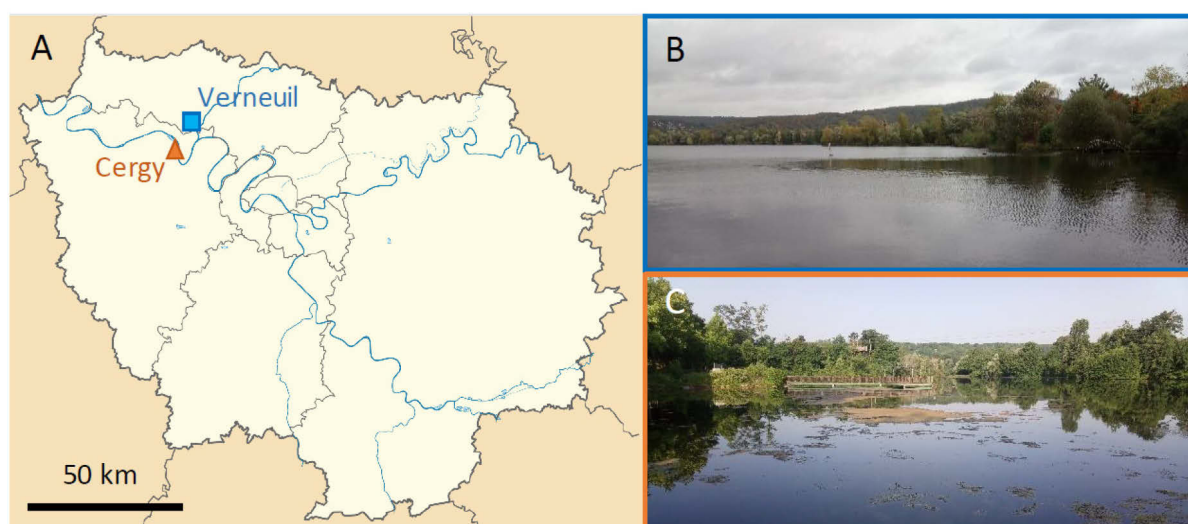


Figure 3.2 Lieux d'échantillonnage. (A) Carte de la région Ile-de-France en France, avec indication de la localisation des étangs de Verneuil (carré bleu) et Cergy-Pontoise (triangle orange). (B) Photo de l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil). (C) Photo de l'étang des Galets (Cergy).

2.2 Echantillonnage

L'eau de surface a été collectée de juin à octobre 2021 (10 dates), avec une fréquence hebdomadaire à partir de la mi-août. A chaque date, le prélèvement a été fait entre 8h et 9h25 pour le site de Cergy et 11h20 et 14h30 pour le site de Verneuil. De l'eau de surface (≈ 20 L) était prélevée à partir d'un ponton s'avancant de quelques mètres dans le lac par rapport à la berge, comme recommandé pour les petits lacs (26). L'ensemble de la stratégie d'échantillonnage est résumé dans la figure 3.3 et les détails des échantillons dans le tableau SIII.I. Avant l'échantillonnage, le pH, la température et la salinité ont été mesurés à l'aide d'une sonde multiparamétrique ProQuatro YSI®.

De l'eau brute (2 L) a été conservée dans un bidon en plastique, à température ambiante et à l'obscurité puis déposée à l'unité de recherche MCAM (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris) le jour même, pour des analyses de chlorophylle-a et le dénombrement du phytoplancton. Les 2 L d'eau ont été filtrés à travers un filtre en fibre de verre avec un seuil de coupure de 0,7 µm (GFF - Whatman) préalablement chauffé à 450 °C pendant une nuit pour le nettoyer de contaminations en matière organique et pré-pesé.

De l'eau brute (30 à 80 ml) a été filtrée à travers un filtre en polycarbonate de 0,22 µm (Isopore™, Merck Millipore®). Les filtres ont été rincés trois fois avec 10 ml d'eau MilliQ®. Puis ils ont été séchés à l'air à température ambiante et montés sur des supports pour le MEB, en aluminium, à l'aide de ruban adhésif double face en carbone. Au laboratoire, les échantillons ont été métallisés par évaporation de carbone pour permettre la conduction des électrons à la surface des échantillons. Les échantillons ont ensuite été stockés à 4 °C jusqu'aux analyses en microscopie électronique à balayage (MEB).

Un concentré (environ 100 mL) de 50 à 200 L des eaux brutes a été obtenu à l'aide d'un filet à phytoplancton de 20 µm de maille. Ce concentré a ensuite été transporté au laboratoire. Cinq cent microlitres ont été centrifugés et le culot a été rincé 3 fois (6600 g pendant 10 min) avec de l'eau MilliQ®. Les culots ont été remis en suspension dans 100-200 µL d'eau MilliQ® ; une aliquote (3 à 6 µL) a été déposée sur une grille de cuivre MET (100 à 200 carrés par grille) recouverte d'une membrane de carbone pré-ionisée et séchée à l'air. Les grilles ont été conservées à 4 °C avant les analyses de microscopie électronique en transmission à balayage (STEM). Le reste du culot a été centrifugé (6600 g pendant 15 min) et rincé 3 fois avec de l'eau MilliQ®. Les culots ont été séchés à 40 °C pendant 48 h et broyés à l'aide d'un mortier en agate. La poudre obtenue a été stockée à température ambiante avant les séances de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et de spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES) au seuil K du Ca.

De l'eau brute (1L) a été filtrée sur une unité de filtration stérile avec un filtre en polyéthersulfone (PES) de 0,22 µm. L'éluat est considéré comme le compartiment « dissous » et a été dispensé sur place comme suit : (i) 40 mL en triplicat dans des tubes en polypropylène (Falcon ©) et acidifiés avec 1,14 mL de HNO₃ (70 %, pour une concentration finale de 2 %) et stockés à 4 °C jusqu'aux analyses élémentaires par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP-AES) ; (ii) 20 mL en triplicat dans des tubes en polypropylène (Falcon ©) et stockés à -20 °C jusqu'aux analyses des nutriments (N et P) ; (iii) 25 mL en triplicat dans des « exetainers » en verre (Labco ©) et acidifiés avec 35 µL de H₃PO₄ (85 %) et stockés à température ambiante dans l'obscurité, jusqu'aux analyses de carbone organique total (COT) ; (iv) 30 mL en triplicat dans des « exetainers » en verre (Labco ©) sans espace de tête, stockés à température ambiante dans l'obscurité jusqu'aux analyses de carbone inorganique dissous (DIC).

Des échantillons d'eau (entre 50 et 1200 mL en fonction de la teneur en particules en suspension) ont été filtrés à 0,22 µm en trois exemplaires à travers des filtres en polycarbonate. Les filtres ont été transportés dans une glacière quelques heures pour être conservés à -80 °C au retour au laboratoire jusqu'à l'extraction des ADN et ARN.

2.3 Dosage de la chlorophylle a, et identification et comptage du phytoplancton

L'identification et le comptage du phytoplancton, par microscopie optique, ont été réalisés par le service "Expertises environnementales" de l'unité de recherche MCAM (Muséum National d'Histoire Naturelle). L'identification taxonomique (au niveau du genre) et les comptages totaux ont été réalisés sur au moins 400 unités de phytoplancton (cellules, trichomes et colonies), sous un microscope inversé Nikon Eclipse TS-100 (400X). Le phytoplancton a été caractérisé dans des échantillons fixés dans du formaldéhyde tamponné (5 % v/v), en utilisant des guides taxonomiques et des clés basées sur des caractéristiques morphologiques, comme décrit dans Talling (1986) (27) et Cronberg et Annadotter (2006) (28) (voir table SIII.II). Par ailleurs, la chlorophylle-a (Chl-a), qui fournit une estimation de la biomasse phytoplanctonique, a été extraite et quantifiée par spectrophotométrie après lyse cellulaire (29).

2.4 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les observations en microscopie électronique à balayage (MEB) ont été réalisées soit sur le MEB Zeiss Ultra55, soit sur le microscope ionique FIB-SEM Zeiss Neon40EsB de la plateforme de microscopie électronique de l'IMP/MC. La tension d'accélération des électrons utilisée était de 15 kV avec une distance de travail de 7,5 mm et un diaphragme de 60 µm, en mode « High Current ». Des images de zones sélectionnées ont été collectées avec un détecteur d'électrons rétrodiffusés (détecteur AsB ou BsD) ou d'électrons secondaires (SE2 ou SESI). Des images de la surface totale des filtres (3,9 cm²) ont aussi été acquises sous forme de mosaïques d'images via le logiciel Atlas 5 (Zeiss) sur les mêmes appareils, en utilisant à la fois un détecteur d'électrons rétrodiffusés (détecteur AsB ou BsD) et d'électrons secondaires (détecteur SE2 ou SESI). La distance de travail était d'environ 10 mm, et le reste des paramètres était identique aux observations. Enfin, des cartographies des différents éléments (Ca, P, K, Mg, Si, S, Fe, Al, Na, Cl) ont été produites à partir d'images hyperspectrales (HyperMap) issues d'une analyse en spectrométrie des rayons X en dispersion d'énergie (EDXS), en utilisant le logiciel Esprit v.2.5.0.175 (Bruker). Les algues du genre *Phacotus* ont été comptées à partir des cartographies réalisées via le logiciel Atlas 5 (Zeiss). Le nombre d'individus a été compté sur trois zones d'une aire de 15 mm² en moyenne. Ce nombre a ensuite été rapporté à l'aire totale du filtre et au volume d'eau filtré.

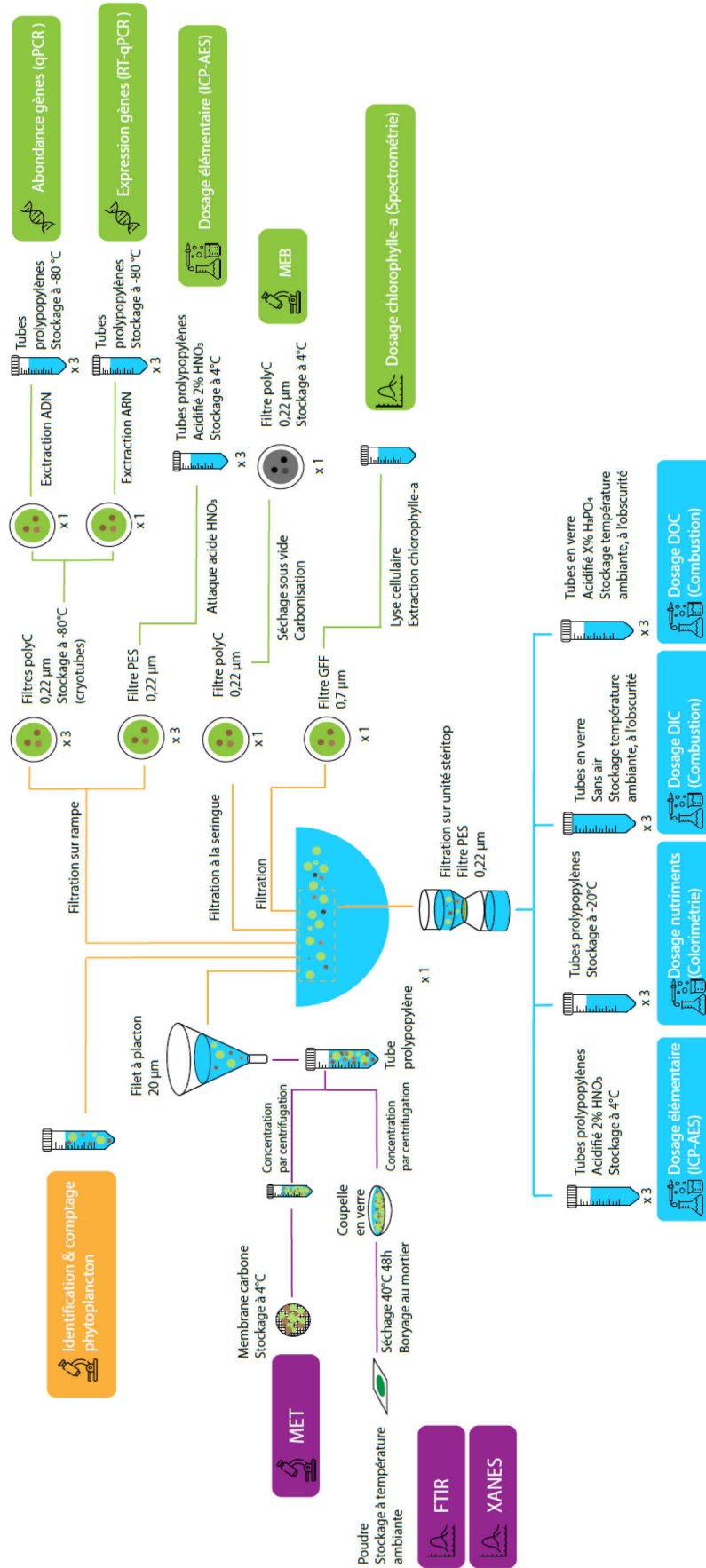


Figure 3.3 Méthodologie d'échantillonnage et d'analyse

2.5 Microscopie électronique en transmission à balayage (STEM)

Les analyses STEM ont été effectuées à l'aide d'un microscope JEOL-2100F fonctionnant à 200 kV, équipé d'un canon à émission de champ, d'un détecteur EDXS JEOL et d'un détecteur annulaire STEM Gatan, qui permet l'imagerie en contraste chimique (dépendance vis-à-vis du numéro atomique Z) en mode HAADF (High Angle Annular Dark Field). La cartographie de la composition chimique élémentaire a été obtenue par analyse de spectrométrie des rayons X en dispersion d'énergie (EDXS) en mode STEM-HAADF, et les données ont été analysées à l'aide du logiciel Analysis station (Jeol).

2.6 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en réflectance totale atténuée (ATR-FTIR)

Les spectres ont été acquis par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en réflectance totale atténuée (ATR-FTIR) dans la région de l'infrarouge moyen ($4000-700\text{ cm}^{-1}$). Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre FTIR NICOLET 6700 équipé d'un élément de réflexion interne en diamant (IRE), d'un séparateur de faisceau KBr et d'un détecteur au tellure de mercure et de cadmium (MCT). L'échantillon (poudre) a été déposé sur l'IRE en diamant. Les spectres ont été accumulés en collectant 64 à 100 balayages avec une résolution de 1 cm^{-1} . Le traitement des spectres, y compris la correction de la ligne de base, la normalisation et l'ajustement des pics, a été effectué à l'aide du logiciel Origin™, selon la méthodologie développée dans Mehta *et al.* 2022 (30). L'échantillon pour la date du 15 septembre pour Cergy a été perdu et n'a donc pas pu être analysé. Pour la date du 15 septembre pour Verneuil, la matière particulaire concentrée au filet à plancton montrait une séparation en deux phases : un surnageant très vert, et un culot de matière ressemblant plus aux échantillons des autres dates. Ces deux phases ont été séparées et séchées séparément, et sont dénommées fraction « haut » et fraction « bas ».

2.7 Spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES/EXAFS)

Des analyses de spectroscopie d'absorption X ont été menées au seuil K du Ca pour déterminer la spéciation du Ca dans la matière particulaire des lacs de Verneuil et de Cergy. Pour quatre dates par site (29/06, 18/06, 25/08 et 15/09), la poudre de matière particulaire concentrée au filet à plancton, obtenue après séchage et broyage, a été pressée en une pastille de 10 mm de diamètre, qui a ensuite été montée sur des porte-échantillons en cuivre exempts de Ca. La quantité optimale d'échantillon de référence nécessaire pour préparer les pastilles pour l'analyse en transmission a été calculée à l'aide du calculateur d'absorption des rayons X XAFSmass, pour obtenir un saut de seuil théorique d'environ 1.

Plusieurs composés de référence ont été achetés chez Sigma Aldrichtm : de la calcite (CaCO_3), du pyrophosphate de calcium ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), de l'acétate de calcium ($(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Ca}$) et de l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Un spectre de calcite magnésienne a été fourni par Alejandro Fernandez-Martinez (ISTerre, Grenoble). Quatre poudres de cultures de *Microcystis* sp. (Collection PMC, Muséum National d'Histoire Naturelle) ont été utilisées comme références pour la biomasse. Les souches formant des iACC sont ici désignées des souches ACC+ et les souches n'en formant pas comme des souches ACC-. Deux souches ACC- et deux souches ACC+ ont été utilisées comme références : *Microcystis* PMC 568 (ACC-), *Microcystis* PMC 810 (ACC-), *Microcystis* PMC 827 (ACC+) et *Microcystis* PMC 831 (ACC+). Toutes les souches ont été cultivées dans un milieu standard BG-11 (31). Toutes les souches de *Microcystis* ont été cultivées sans agitation, à 23 °C, avec une photopériode de 12h/12h et une intensité lumineuse de $\approx 5 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Les suspensions cellulaires de toutes les souches ont été récoltées par centrifugation, rincées et séchées à 40 °C pendant 48 heures. La présence/absence d'ACC dans ces différentes souches a été évaluée dans une étude précédente par spectroscopie FTIR et microscopie électronique (9,32).

La spectroscopie d'absorption des rayons X (combinant XANES et EXAFS) a été menée au seuil K du Ca, sur la ligne de lumière LUCIA au synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France) en mode macrofaisceau (taille du faisceau ≈ 2.5 mm). Le monochromateur était équipé de cristaux de Si (111). Les spectres ont été enregistrés sur les échantillons naturels en fluorescence, à l'aide d'un détecteur à dérive en silicium mono-élémentaire de 60 mm² (Bruker). Les spectres pour les références ont été acquis en transmission, à l'aide d'une diode en silicium. Les détails de l'acquisition des spectres et du protocole d'analyse sont mentionnés dans Mehta *et al.* (in rev) (33). (voir annexe n°3).

Brièvement, l'ajustement par combinaison linéaire (LCF) des spectres dérivés XANES des matières particulaires a été réalisé en utilisant une combinaison de composants représentant la gamme de spéciation possible du Ca présent dans l'échantillon (comme observé par MEB, STEM-HAADF, FTIR, et les ensembles de données de la chimie des solutions sur ces échantillons). Ces composants sont les suivants : (i) *Microcystis* PMC 827 (ACC+) a été utilisée comme composant de référence pour la spéciation du Ca dans les iACC ; (ii) *Microcystis* PMC 568 (ACC-) et l'acétate de calcium ont été utilisés comme composants de référence représentant le Ca complexé à la matière organique ; (iii) La calcite et la calcite magnésienne représentaient la spéciation du Ca dans les carbonates cristallins ; (iv) L'hydroxyapatite et le pyrophosphate de calcium représentaient la spéciation du Ca dans les phases Ca-P. Le meilleur ajustement LCF a été déterminé pour la combinaison de n composants pour laquelle le facteur R (R-factor) était meilleur que 10 % de l'ajustement avec n+1 composants. Nous ne présentons ici que les résultats des meilleurs ajustements.

2.8 Analyses élémentaires (ICP-AES)

Les concentrations de certains éléments majeurs et mineurs (Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Si, Sr) des fractions dissoute et particulaire des échantillons ont été mesurées par

spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP-AES) sur l'appareil iCAP6200 ThermoScientific de la plateforme PARI de l'Institut de physique du globe de Paris (IPGP). Pour la fraction particulaire, la concentration élémentaire mesurée à ensuite été ramenée au poids de la matière sèche sur filtre d'une part et au volume d'eau filtrée d'autre part.

2.9 Mesures du carbone inorganique (DIC) et organique dissous (DOC)

Les concentrations en carbone organique dissous (DOC) ont été mesurées par combustion sur l'analyseur TOC (Total Organic Carbon) Shimadzu® de la plateforme PARI de l'IPGP. Les concentrations en carbone inorganique dissous (DIC) ont été mesurées par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à rapport isotopique (Analytical Precision 2003 GC-IRMS) selon le protocole d'Assayag et al. (2006) (34), sur la même plateforme.

Les valeurs d' HCO_3^- et de CO_3^{2-} ont été déterminées à partir de la mesure du DIC, en considérant qu'à $\text{pH} > 7$:

$$\text{DIC} = \text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-} \text{ (éq. 1)}$$

La réaction de dissociation $\text{HCO}_3^- = \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+$ a une constante d'équilibre $\text{pKa} = 10,3$.

On peut ainsi écrire :

$$\log(\text{Ka}) = \log(\text{H}^+) + \log(\text{CO}_3^{2-}) - \log(\text{HCO}_3^-) \text{ (éq. 2)}$$

Ce qui donne en utilisant l'équation 1 :

$$\log\left(\frac{\text{Ka}}{\text{H}^+}\right) = \log\left(\frac{(\text{DIC} - \text{HCO}_3^-)}{\text{HCO}_3^-}\right)$$

Comme $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$ et $\text{pKa} = -\log(\text{Ka})$, et en utilisant les propriétés du log, nous déduisons la formule suivante :

$$\text{HCO}_3^- = \frac{\text{DIC}}{\frac{10^{-\text{pKa}}}{10^{-\text{pH}}} + 1}$$

Et CO_3^{2-} est déduit grâce à (éq.1).

2.10 Analyses des nutriments N et P (colorimétrie)

Les ions phosphates (PO_4^{3-}), sulfates (SO_4^{2-}), chlorure (Cl^-) et les espèces azotées (NH_4^+ , NO_3^{2-} et NO_2^-) ont été mesurés à l'aide d'un analyseur d'azote à flux continu Gallery (ThermoFisher) de la Halle technologique GESE (Génie Environnemental, Sols et Eaux) de Sorbonne Université.

2.11 Extraction des ADN et ARN

L'ADN total a été extrait à l'aide du kit FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals), selon Louati *et al.* 2023 (35). Brièvement, chaque filtre a été transféré dans des tubes Lysing Matrix E (MP Biomedicals, Illkirch, France) avec 1,1 mL de tampon de lyse. Une lyse mécanique a été réalisée 3 fois 30s à une vitesse de $6,5 \text{ m.s}^{-1}$ (Fast-Prep1-24, MP Biomedicals, France). Les débris de filtres ont été éliminés par centrifugation à $14\ 000 \text{ g}$ pendant 5 minutes et les surnageants ont été purifiés selon les instructions du fabricant. Les ADN ont été conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse.

Parallèlement à l'extraction des ADN, les ARN ont été extraits à l'aide du kit All prep DNA/RNA Mini (Qiagen), selon Hugoni *et al.* (2013) (36), avec la modification suivante : les filtres ont été transférés dans des tubes Matrix E (MP Biomedicals, Illkirch, France) avec $900 \mu\text{L}$ de tampon de lyse (10 mM EDTA, 25 mM TRIS, 50 mM glucose). Une lyse mécanique a été réalisée 3 fois 30 s à une vitesse de $6,5 \text{ m.s}^{-1}$ (Fast-Prep1-24, MP Biomedicals, France). Une lyse chimique a été réalisée par ajout de lysozyme ($0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$) et incubation à 37 °C pendant 45 minutes sous agitation, puis ajout de SDS (dodécylsulfate de sodium 1 %) et de la protéinase K (Thermo Scientific, France) avec incubation à 55 °C pendant 90 minutes. Les débris de filtre ont été éliminés par centrifugation à $14\ 000 \text{ g}$ pendant 5 minutes. Les surnageants ont été incubés avec $500 \mu\text{L}$ de tampon RLT, transférés dans les colonnes ADN-Qiagen, et centrifugés à $12\ 000 \text{ g}$ pendant 30 s. L'éluat a été transféré dans les colonnes RNeasy-Qiagen, avec de l'éthanol 70 %, puis lavé avec $350 \mu\text{L}$ de tampon RW1 suivi de tampons RPE par centrifugation à $8\ 000 \text{ g}$ pendant 15 secondes. Les ARN totaux sont ensuite élués avec $30 \mu\text{L}$ d'eau MilliQ, puis traités à la DNase (kit Turbo DNA-free, Invitrogen) selon les instructions du fabricant. La quantité et la qualité des ARN ont été mesurées avec le NanoDrop (ThermoFisher).

Une étape de reverse-transcription a été réalisée à partir d' $1 \mu\text{g}$ d'ARN total à l'aide du kit High-capacity RNA-to-cDNA™ (Applied Biosystems), selon les instructions du fabricant. Les ARN et ADNc ont été conservés à -20 °C .

2.12 Quantification des populations bactériennes, cyanobactériennes, et de *Microcystis*

Les abondances totales de bactéries, de cyanobactéries et de *Microcystis* ont été quantifiées par qPCR en utilisant plusieurs amorces ciblant l'ADNr 16S (tableau III.II). Les amorces pour l'amplification spécifique du gène *ccyA* de *Microcystis* ont été conçues sur la base du génome des 115 souches positives (génomés complets et MAG). Après clustering à 100 % d'identité, 40 séquences ont été conservées, incluant 16 d'origine environnementale, et alignées avec MAFFT (Katoh *et al.* 2019) (37) en utilisant l'option L-INS-I, ainsi qu'une vérification manuelle, pour identifier les régions conservées susceptibles pour des amorces spécifiques. La spécificité de ces régions a été vérifiée par BLAST (38) contre la database non-

redondante de GenBank. Deux régions hautement spécifiques ont pu être identifiées pour toutes les séquences de *ccyA* de *Microcystis*.

Les réactions ont été réalisées dans un système de détection PCR en temps réel CFX96 (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) avec un volume de réaction de 20 µL contenant le SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Marne la Coquette, France), 1 mM de chaque amorce, 2 µM d'albumine de sérum bovin et 0,4 et 4 ng d'ADN ou d'ADNc. Les échantillons ont été mesurés en triplicat, avec au moins deux runs de PCR différents. Les courbes standards ont été obtenues en utilisant des dilutions en séries de plasmides linéarisés contenant les gènes étudiés respectivement amplifiés à partir de *Pseudomonas fluorescens* (séquences ARNr 16S), et de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (séquences ARNr 16S et gène *ccyA*). L'abondance des gènes a été déterminée en triplicat et le nombre de copies de gènes calculé a été exprimé par mL d'eau. Un ratio de cellules *Microcystis ccyA+* (en faisant l'hypothèse d'une copie de ce gène par génome) sur l'abondance totale des cellules *Microcystis* a été estimé. Pour cela nous avons utilisé le chiffre de 1,3 copies du gène d'ADNr 16S par génome de *Microcystis*, chiffre moyen obtenu de l'analyse de 403 assemblages de génomes de *Microcystis* disponibles dans GenBank et RefSeq (avril 2023).

Tableau III.II. Couples d'amorces utilisées dans le cadre de cette étude

Sonde	Spécificité	Séquence (5' à 3')	Référence
16S-341F	ADNr16S	CCTACGGGAGGCAGCAG	Bru et al., 2011 (39)
16S-515R	Bactérien	ATTACCGCGGCTGCTGGCA	
16S - 184F	ADNr16S	GCCGCRAAGTGAAMCTAA	Singh 2015 (40)
16S - 431R	Cyanobactérie	AATCCAAARACCTTCCTCCC	
16S - 671F	ADNr16S	CGTGCTACTGGGCTGTAT	Rinta Kanto 2005
16S - 780R	<i>Microcystis</i>	TCGGGTGCATACAAGCC	(41)
ccyA1-F	Gène <i>ccyA</i>	CTCCTCAAAGCCACCCAAGA	Cette étude
ccyA1-R	<i>Microcystis</i>	TTGCCAGTGGCTGAGACGA	

2.13 Analyses des données

2.13.1 Diagrammes de Piper

La version 6.77 du logiciel d'hydrochimie Diagrammes, mise à disposition par le laboratoire d'Hydrogéologie d'Avignon a été utilisée pour générer les diagrammes de Piper.

2.13.2 Calculs des activités des espèces chimiques

Les valeurs des activités proviennent des calculs de spéciation effectués avec le logiciel PHREEQC version 3.7.3, en utilisant la base de données ThermodemV1.10_15Dec2020.dat.

La moyenne des concentrations des différents éléments (Ca, Mg, Na, K, Si, Fe, Al, Sr) mesurées en ICP-AES, la moyenne des concentrations de Cl⁻, la moyenne des concentrations en DIC, le pH et la température ont été utilisés pour calculer les activités des différentes

espèces chimiques et les valeurs de saturation des solutions par rapport à différentes phases minérales, à l'aide du logiciel PHREEQC version 3.7.3, en utilisant la base de données ThermoddemV1.10_15Dec2020.dat.

2.14 Statistiques

L'ensemble des tests statistiques ont été réalisés en utilisant R studio (version 1.4.1106, <http://www.R-project.org>). Les coefficients de corrélations de Pearson (42) et Spearman (43), ainsi que leur seuil de significativité (p-value), ont été calculés en utilisant la fonction rcorr du package Hmisc (5.1-0).

2.15 Analyse des compositions chimiques élémentaires globales sur la matière particulaire

Les compositions chimiques globales obtenues sur la matière particulaire en suspension dans les lacs de Cergy et de Verneuil ont été converties en compositions molaires en divisant les poids d'oxydes par leurs masses molaires respectives. Puis des projections ternaires ont été construites à l'aide du logiciel RStudio, notamment à l'aide de la librairie Ternary. Différents essais ont été faits avec différents pôles. Les projections ternaires permettant d'observer des tendances dans les variations de compositions pour les deux lacs considérés séparément ou ensemble ont été conservées.

Tableau III.III Report des données géochimiques de l'étang des Galets (Cergy) et de l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil). La balance des charges (Bal) a été calculée selon la formule suivante $Bal = (\Sigma cations - \Sigma anions) / (\Sigma cations + \Sigma anions)$. La moyenne a été calculée sur les trois triplicats techniques (sauf la conductivité, pH et température (Temp))

Sites	Date	Conductivité mS/cm	pH	Temp °C	DIC mM	DOC mM	Al µM	B µM	Ca µM
Cergy	19/06/2021	0.2658	9	22.7	1.49 ± 0.02	0.01 ± 0.001	0.13 ± 0.03	0.14 ± 0.00	636.63 ± 12.23
Cergy	20/07/2021	0.251	9.03	23.9	1.29 ± 0.02	0.67 ± 0.041	0.20 ± 0.02	0.11 ± 0.00	557.75 ± 7.29
Cergy	18/08/2021	0.2681	8.97	21.7	1.38 ± 0.01	0.64 ± 0.006	0.21 ± 0.04	0.13 ± 0.00	562.49 ± 5.63
Cergy	25/08/2021	0.2799	8.67	20.6	1.51 ± 0.01	0.68 ± 0.060	0.17 ± 0.02	0.14 ± 0.00	613.69 ± 5.72
Cergy	07/09/2021	0.2813	9.15	22.6	1.48 ± 0.02	0.69 ± 0.049	0.63 ± 0.07	0.14 ± 0.00	600.26 ± 10.33
Cergy	15/09/2021	0.2826	8.84	21.9	1.53 ± 0.02	0.67 ± 0.044	0.59 ± 0.16	0.15 ± 0.00	623.43 ± 9.35
Cergy	29/09/2021	0.3158	7.93	18.9	2.04 ± 0.03	0.71 ± 0.064	0.43 ± 0.02	0.18 ± 0.00	787.83 ± 13.26
Cergy	06/10/2021	0.3294	7.94	15.7	2.24 ± 0.03	0.66 ± 0.026	0.43 ± 0.05	0.19 ± 0.01	881.74 ± 39.36
Cergy	13/10/2021	0.3255	8.29	14.7	2.15 ± 0.01	0.68 ± 0.031	0.75 ± 0.57	0.17 ± 0.00	841.45 ± 32.02
Cergy	20/10/2021	0.3235	8.38	15.2	2.11 ± 0.00	0.69 ± 0.017	0.39 ± 0.05	0.17 ± 0.01	845.80 ± 33.15
Verneuil	19/06/2021	0.2998	8.75	22	1.74 ± 0.01	0.01 ± 0.001	0.22 ± 0.02	0.16 ± 0.00	928.62 ± 12.74
Verneuil	20/07/2021	NA	9.32	26.1	1.82 ± 0.02	0.62 ± 0.006	0.19 ± 0.02	0.15 ± 0.00	1050.95 ± 12.19
Verneuil	18/08/2021	0.311	9.64	21.9	1.47 ± 0.03	0.70 ± 0.012	0.32 ± 0.02	0.14 ± 0.00	964.99 ± 12.97
Verneuil	25/08/2021	0.3139	9.66	21.7	1.51 ± 0.03	0.72 ± 0.059	0.37 ± 0.01	0.14 ± 0.00	996.58 ± 20.04
Verneuil	07/09/2021	0.3154	10.1	24.1	1.44 ± 0.03	0.92 ± 0.020	0.94 ± 0.04	0.16 ± 0.00	998.90 ± 6.11
Verneuil	15/09/2021	0.333	8.6	22.3	2.03 ± 0.08	0.88 ± 0.025	0.67 ± 0.02	0.14 ± 0.00	992.62 ± 20.99
Verneuil	29/09/2021	0.338	8.08	19.2	2.08 ± 0.03	0.74 ± 0.070	0.37 ± 0.02	0.17 ± 0.00	1008.60 ± 23.00
Verneuil	06/10/2021	0.3399	8.17	16.9	2.12 ± 0.03	0.73 ± 0.000	0.45 ± 0.05	0.17 ± 0.00	1030.33 ± 7.45
Verneuil	13/10/2021	0.3424	8.18	16	2.20 ± 0.05	0.79 ± 0.068	0.78 ± 0.30	0.17 ± 0.01	1085.31 ± 18.84
Verneuil	20/10/2021	0.3506	7.66	15.6	2.18 ± 0.07	0.81 ± 0.017	0.46 ± 0.08	0.18 ± 0.00	1094.16 ± 18.50

Fe μM	K μM	Mg μM	Mn μM	Na μM	P μM	S μM	Si μM
0.22 ± 0.01	70.06 ± 1.33	370.02 ± 11.24	0.08 ± 0.01	652.99 ± 11.89	NA	267.71 ± 8.84	9.77 ± 1.24
0.24 ± 0.01	67.14 ± 0.78	364.55 ± 4.91	0.05 ± 0.00	649.38 ± 8.40	NA	265.31 ± 5.39	4.06 ± 0.09
0.10 ± 0.00	72.61 ± 0.46	370.57 ± 1.48	0.04 ± 0.00	663.24 ± 6.17	NA	263.66 ± 1.36	17.46 ± 0.25
0.08 ± 0.00	76.37 ± 0.88	372.61 ± 3.11	0.04 ± 0.00	668.49 ± 3.91	NA	261.04 ± 2.10	18.80 ± 0.05
0.11 ± 0.00	80.09 ± 1.03	369.75 ± 5.92	0.02 ± 0.00	668.45 ± 10.07	NA	259.43 ± 4.58	12.39 ± 0.29
0.11 ± 0.00	85.08 ± 1.63	371.51 ± 1.76	0.03 ± 0.00	668.71 ± 11.05	NA	258.53 ± 0.61	11.28 ± 0.40
0.16 ± 0.02	92.37 ± 1.94	390.25 ± 1.78	0.11 ± 0.00	665.45 ± 12.12	NA	260.43 ± 0.60	16.06 ± 0.32
0.13 ± 0.01	95.76 ± 3.76	392.81 ± 8.98	0.04 ± 0.00	669.38 ± 28.93	NA	255.70 ± 6.06	20.85 ± 0.80
0.11 ± 0.01	91.09 ± 3.59	385.67 ± 6.54	0.03 ± 0.00	653.52 ± 25.17	NA	250.78 ± 3.95	14.13 ± 0.54
0.18 ± 0.06	93.16 ± 4.08	389.88 ± 12.46	NA ± NA	668.65 ± 32.09	NA	253.85 ± 6.97	10.48 ± 0.42
0.23 ± 0.01	99.23 ± 1.37	291.01 ± 5.44	0.04 ± 0.01	589.45 ± 9.85	1.29 ± 0.21	427.12 ± 5.26	30.22 ± 0.48
0.13 ± 0.00	100.93 ± 0.60	295.76 ± 3.89	0.09 ± 0.00	590.72 ± 6.10	4.10 ± 0.05	419.54 ± 5.99	2.97 ± 0.07
0.16 ± 0.00	101.27 ± 0.60	293.08 ± 8.90	0.38 ± 0.01	592.98 ± 5.66	4.33 ± 0.08	404.05 ± 12.71	29.95 ± 0.29
0.23 ± 0.01	103.63 ± 1.73	301.26 ± 3.80	0.43 ± 0.01	602.62 ± 10.73	5.77 ± 0.13	410.62 ± 7.19	38.57 ± 0.70
0.33 ± 0.00	102.33 ± 1.04	295.94 ± 1.98	0.47 ± 0.00	597.35 ± 3.17	4.55 ± 0.02	408.57 ± 2.27	48.90 ± 0.31
0.13 ± 0.01	103.17 ± 2.51	292.53 ± 4.37	0.04 ± 0.00	588.88 ± 14.25	5.45 ± 0.06	402.11 ± 7.10	40.98 ± 0.81
0.04 ± 0.01	101.40 ± 2.30	289.91 ± 8.54	NA ± NA	586.78 ± 12.06	6.94 ± 0.15	384.58 ± 11.56	4.59 ± 0.10
0.05 ± 0.01	102.43 ± 0.83	294.30 ± 4.84	NA ± NA	591.69 ± 6.10	7.62 ± 0.16	384.44 ± 6.55	5.41 ± 0.07
0.08 ± 0.01	107.27 ± 1.88	306.36 ± 9.86	0.15 ± 0.01	613.59 ± 8.58	8.31 ± 0.39	399.07 ± 11.08	6.69 ± 0.20
0.31 ± 0.00	106.52 ± 1.37	297.17 ± 2.70	1.49 ± 0.02	605.22 ± 11.72	9.89 ± 0.10	389.83 ± 4.44	10.97 ± 0.17

Sr μM	SO ₄ ²⁻ μM	PO ₄ ³⁻ μM	NH ₄ ⁺ μM	Cl ⁻ μM	CO ₃ ²⁻ μM	HCO ₃ ⁻ mM	Σ Cations μeq/L	Σ Anions μeq/L	Bal %	Mg/Ca
3.77 ± 0.08	271.27 ± 0.97	NA	3.76 ± 0.06	764.14 ± 1.41	70.95	1.42	2736.34	2864.43	-2.3	0.58
3.61 ± 0.05	275.20 ± 0.39	NA	4.98 ± 1.25	767.87 ± 3.33	65.75	1.22	2561.12	2674.13	-2.2	0.65
3.66 ± 0.04	269.24 ± 3.39	NA	NA	792.10 ± 2.20	61.51	1.32	2601.98	2768.88	-3.1	0.66
3.75 ± 0.03	268.68 ± 1.34	NA	NA	807.09 ± 2.65	34.51	1.47	2717.46	2885.77	-3	0.61
3.70 ± 0.06	271.62 ± 1.99	NA	NA	821.88 ± 1.55	97.63	1.38	2688.55	2939.56	-4.5	0.62
3.74 ± 0.07	263.00 ± 1.30	4.82 ± 0.81	5.08 ± 0.75	800.66 ± 5.52	51.38	1.48	2743.66	2911.52	-3	0.60
4.00 ± 0.08	256.15 ± 3.10	NA	4.39 ± 0.86	806.75 ± 5.98	8.65	2.03	3113.99	3364.55	-3.9	0.50
4.19 ± 0.20	241.35 ± 8.16	NA	7.60 ± 1.34	799.19 ± 10.49	9.72	2.23	3314.24	3528.46	-3.1	0.45
4.05 ± 0.17	249.52 ± 2.16	NA	3.62 ± 0.04	802.91 ± 7.15	20.78	2.13	3198.84	3469.57	-4.1	0.46
4.12 ± 0.21	258.42 ± 1.67	NA	NA	802.12 ± 9.07	25.07	2.08	3233.17	3454.20	-3.3	0.46
3.69 ± 0.06	429.34 ± 6.57	NA	NA	694.62 ± 9.13	47.60	1.69	3127.94	3337.73	-3.2	0.31
3.82 ± 0.04	423.22 ± 5.84	2.65 ± 0.31	NA	710.39 ± 5.40	172.20	1.64	3385.09	3545.85	-2.3	0.28
3.70 ± 0.04	405.26 ± 4.60	2.51 ± 0.89	NA	712.64 ± 12.36	263.27	1.20	3210.39	3253.24	-0.7	0.30
3.78 ± 0.07	408.97 ± 8.51	3.05 ± 0.65	NA	726.81 ± 5.63	282.07	1.23	3301.93	3340.30	-0.6	0.30
3.75 ± 0.02	408.42 ± 4.46	1.79 ± 0.21	4.86 ± 0.28	735.01 ± 2.07	555.79	0.88	3289.36	3544.47	-3.7	0.30
3.71 ± 0.10	406.84 ± 2.13	4.01 ± 2.10	13.95 ± 2.23	715.50 ± 11.45	39.78	1.99	3262.35	3602.43	-5	0.29
3.72 ± 0.09	404.17 ± 4.05	5.65 ± 0.25	10.00 ± 1.02	708.06 ± 2.69	12.46	2.07	3285.19	3609.04	-4.7	0.29
3.78 ± 0.04	407.98 ± 2.30	5.72 ± 0.54	22.37 ± 1.20	710.85 ± 11.02	15.60	2.10	3343.38	3662.58	-4.6	0.29
3.94 ± 0.06	403.48 ± 3.24	4.96 ± 0.85	21.13 ± 0.87	709.33 ± 6.03	16.56	2.18	3504.21	3733.03	-3.2	0.28
3.91 ± 0.09	421.30 ± 4.83	7.58 ± 1.05	47.64 ± 0.87	717.66 ± 11.21	4.99	2.18	3494.40	3748.77	-3.5	0.27

Tableau III.IV Report des données géochimiques du compartiment particulaire (< 0,22 µm) des sites de l'étang des Galets (Cergy) et de la Grosse Pierre (Verneuil). Les concentrations ramenées au poids de la matière sèche sur filtre sont exprimés en mg/g. Celles ramenées au volume d'eau filtrée sont exprimés en µM. La moyenne a été calculée sur les trois triplicats techniques

Sites	Date	Al mg/g	B mg/g	Ca mg/g	Fe mg/g	K mg/g	Mg mg/g	Mn mg/g
Cergy	19/06/2021	1.46 ± 0.78	0.23 ± 0.01	61.17 ± 13.35	6.11 ± 1.68	2.57 ± 0.31	7.01 ± 1.53	10.95 ± 1.19
Cergy	20/07/2021	0.88 ± 0.36	0.19 ± 0.02	88.91 ± 4.35	4.43 ± 0.25	3.20 ± 0.20	7.16 ± 0.62	4.96 ± 0.50
Cergy	18/08/2021	0.83 ± 0.14	0.14 ± 0.01	24.65 ± 1.04	3.54 ± 0.12	5.38 ± 0.17	3.76 ± 0.33	5.95 ± 0.33
Cergy	25/08/2021	1.17 ± 0.24	0.21 ± 0.01	31.12 ± 3.44	4.54 ± 0.30	4.44 ± 0.19	5.57 ± 0.28	11.78 ± 0.15
Cergy	07/09/2021	0.73 ± 0.09	0.19 ± 0.02	26.66 ± 3.95	4.93 ± 0.99	2.26 ± 0.37	3.76 ± 0.60	6.26 ± 1.08
Cergy	15/09/2021	2.27 ± 0.44	0.45 ± 0.09	47.89 ± 9.11	8.37 ± 1.64	3.88 ± 0.74	6.30 ± 1.27	21.30 ± 4.12
Cergy	29/09/2021	1.30 ± 0.32	0.28 ± 0.06	27.65 ± 8.47	8.62 ± 2.63	2.03 ± 0.61	3.86 ± 1.22	21.79 ± 6.00
Cergy	06/10/2021	1.79 ± 0.63	0.21 ± 0.06	34.38 ± 11.31	10.22 ± 3.49	3.38 ± 1.49	3.83 ± 1.41	11.80 ± 4.10
Cergy	13/10/2021	1.52 ± 0.44	0.32 ± 0.10	30.97 ± 5.77	5.69 ± 1.39	3.85 ± 0.81	4.04 ± 0.74	7.42 ± 1.69
Cergy	20/10/2021	1.80 ± 0.41	0.27 ± 0.11	35.84 ± 9.64	7.93 ± 2.12	2.63 ± 1.28	4.38 ± 1.20	9.14 ± 2.78
Verneuil	19/06/2021	1.71 ± 0.82	0.15 ± 0.04	38.99 ± 8.92	6.32 ± 2.16	2.36 ± 0.73	2.22 ± 0.63	6.03 ± 1.68
Verneuil	20/07/2021	0.84 ± 0.41	0.22 ± 0.01	30.22 ± 4.17	3.48 ± 0.49	3.32 ± 0.48	3.04 ± 0.69	8.39 ± 1.45
Verneuil	18/08/2021	0.95 ± 0.48	0.16 ± 0.11	13.65 ± 5.06	1.35 ± 0.62	2.25 ± 1.16	1.61 ± 0.67	2.27 ± 1.08
Verneuil	25/08/2021	1.97 ± 0.13	0.56 ± 0.12	29.51 ± 0.68	3.01 ± 0.23	2.57 ± 0.20	2.40 ± 0.10	10.54 ± 0.82
Verneuil	07/09/2021	0.62 ± 0.15	0.16 ± 0.03	17.77 ± 1.91	1.46 ± 0.19	4.00 ± 0.49	3.31 ± 0.35	2.34 ± 0.33
Verneuil	15/09/2021	0.67 ± 0.03	0.46 ± 0.05	15.39 ± 0.65	1.06 ± 0.06	3.28 ± 0.33	2.19 ± 0.10	2.56 ± 0.12
Verneuil	29/09/2021	0.58 ± 0.08	0.18 ± 0.02	15.51 ± 1.81	1.81 ± 0.22	5.00 ± 0.36	2.17 ± 0.23	11.67 ± 1.37
Verneuil	06/10/2021	1.01 ± 0.20	0.16 ± 0.04	25.26 ± 4.22	3.03 ± 0.56	3.70 ± 1.26	1.86 ± 0.34	6.22 ± 1.19
Verneuil	13/10/2021	1.22 ± 0.21	0.27 ± 0.05	24.58 ± 1.78	4.59 ± 0.97	2.94 ± 0.28	1.78 ± 0.06	8.19 ± 1.90
Verneuil	20/10/2021	2.22 ± 0.60	0.37 ± 0.24	48.62 ± 11.99	6.82 ± 1.83	3.58 ± 0.75	2.46 ± 0.60	3.01 ± 0.71

Na mg/g	P mg/g	S mg/g	Si mg/g	Sr mg/g	Al μM	B μM	Ca μM	Fe μM
1.81 ± 1.52	4.28 ± 0.51	3.18 ± 0.58	1.43 ± 0.40	0.27 ± 0.05	0.13 ± 0.07	0.00 ± 0.00	3.68 ± 1.24	0.27 ± 0.13
4.57 ± 5.19	3.69 ± 0.48	3.52 ± 0.27	2.46 ± 0.83	0.42 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.00 ± 0.00	3.22 ± 0.25	0.11 ± 0.01
3.60 ± 1.92	4.91 ± 0.38	4.20 ± 0.21	2.65 ± 0.89	0.15 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.00 ± 0.00	2.21 ± 0.29	0.23 ± 0.03
0.62 ± 0.03	5.32 ± 0.11	3.99 ± 0.13	3.27 ± 0.37	0.17 ± 0.01	0.13 ± 0.03	0.00 ± 0.00	2.29 ± 0.33	0.24 ± 0.02
NA	4.09 ± 0.64	3.92 ± 0.53	8.37 ± 2.50	0.19 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.00 ± 0.00	1.39 ± 0.14	0.18 ± 0.02
NA	6.70 ± 1.42	7.01 ± 1.42	14.45 ± 8.81	0.33 ± 0.07	0.11 ± 0.02	0.00 ± 0.00	1.51 ± 0.19	0.19 ± 0.01
NA	5.14 ± 1.43	5.36 ± 1.57	1.52 ± 0.47	0.20 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.99 ± 0.10	0.22 ± 0.03
0.89 ± NA	8.68 ± 3.24	5.61 ± 2.11	5.73 ± 2.36	0.19 ± 0.06	0.06 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.79 ± 0.06	0.17 ± 0.02
1.21 ± 0.11	8.79 ± 1.51	6.18 ± 0.84	3.57 ± 1.67	0.20 ± 0.04	0.07 ± 0.01	0.00 ± 0.00	1.04 ± 0.11	0.14 ± 0.01
NA	7.53 ± 3.26	5.66 ± 1.79	8.64 ± 2.29	0.19 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.90 ± 0.13	0.14 ± 0.02
2.11 ± 1.68	3.23 ± 0.85	2.76 ± 0.98	1.43 ± 1.11	0.15 ± 0.03	0.56 ± 0.38	0.01 ± 0.00	8.04 ± 1.51	0.92 ± 0.20
6.99	5.56 ± 0.71	3.36 ± 0.82	1.99 ± 1.33	0.17 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.00 ± 0.00	2.27 ± 0.21	0.20 ± 0.00
2.14 ± 0.80	5.88 ± 0.47	4.97 ± 0.06	2.11 ± 1.76	0.06 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.01 ± 0.00	3.63 ± 0.68	0.25 ± 0.02
0.79 ± 0.37	5.83 ± 0.47	5.00 ± 0.40	7.54 ± 1.22	0.15 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.02 ± 0.00	3.73 ± 0.18	0.27 ± 0.01
NA	11.44 ± 1.15	4.10 ± 0.54	0.93 ± 0.79	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.00 ± 0.00	1.70 ± 0.21	0.10 ± 0.02
0.71 ± 0.30	7.40 ± 0.40	5.17 ± 0.18	3.42 ± 0.68	0.09 ± 0.01	0.30 ± 0.03	0.04 ± 0.01	4.66 ± 0.48	0.23 ± 0.03
NA	8.67 ± 0.90	4.86 ± 0.71	1.36 ± 0.29	0.09 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.01 ± 0.00	2.67 ± 0.29	0.22 ± 0.01
NA	6.49 ± 1.01	4.29 ± 0.71	3.71 ± 1.16	0.10 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.01 ± 0.00	7.21 ± 0.64	0.62 ± 0.05
0.84 ± 0.21	6.65 ± 0.60	4.57 ± 0.28	5.09 ± 1.26	0.11 ± 0.01	0.35 ± 0.06	0.01 ± 0.00	4.80 ± 0.76	0.63 ± 0.11
1.98 ± 0.48	9.07 ± 1.88	5.68 ± 1.32	9.03 ± 2.01	0.22 ± 0.06	0.16 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.39 ± 0.20	0.24 ± 0.02

K μM	Mg μM	Mn μM	Na μM	P μM	S μM	Si μM	Sr μM
0.16 ± 0.04	0.70 ± 0.28	0.47 ± 0.06	0.21 ± 0.22	0.32 ± 0.06	0.24 ± 0.09	0.12 ± 0.05	0.01 ± 0.00
0.12 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.28 ± 0.30	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.04	0.01 ± 0.00
0.49 ± 0.04	0.56 ± 0.11	0.39 ± 0.02	0.58 ± 0.37	0.57 ± 0.02	0.47 ± 0.07	0.35 ± 0.15	0.01 ± 0.00
0.33 ± 0.02	0.67 ± 0.06	0.63 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.51 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.34 ± 0.05	0.01 ± 0.00
0.12 ± 0.01	0.32 ± 0.03	0.24 ± 0.02	NA NA	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.63 ± 0.23	0.00 ± 0.00
0.13 ± 0.02	0.33 ± 0.04	0.49 ± 0.04	0.13 NA	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.67 ± 0.39	0.00 ± 0.00
0.07 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.57 ± 0.08	NA NA	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.00 ± 0.00
0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.03 ± NA	0.26 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.00 ± 0.00
0.14 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.39 ± 0.08	0.26 ± 0.02	0.17 ± 0.06	0.00 ± 0.00
0.06 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.01	NA NA	0.24 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.32 ± 0.13	0.00 ± 0.00
0.50 ± 0.13	0.76 ± 0.18	0.89 ± 0.07	0.69 ± 0.39	0.85 ± 0.12	0.72 ± 0.23	0.39 ± 0.27	0.01 ± 0.00
0.26 ± 0.02	0.38 ± 0.04	0.49 ± 0.02	0.79 0.13	0.55 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.23 ± 0.09	0.01 ± 0.00
0.59 ± 0.02	0.70 ± 0.10	0.43 ± 0.03	1.22 ± 1.01	2.30 ± 1.39	1.84 ± 1.01	0.69 ± 0.26	0.01 ± 0.00
0.33 ± 0.02	0.50 ± 0.03	0.97 ± 0.05	0.17 ± 0.07	0.96 ± 0.11	0.79 ± 0.10	1.36 ± 0.17	0.01 ± 0.00
0.39 ± 0.05	0.52 ± 0.07	0.17 ± 0.04	NA NA	1.43 ± 0.24	0.49 ± 0.05	0.14 ± 0.13	0.01 ± 0.00
1.02 ± 0.17	1.09 ± 0.12	0.56 ± 0.06	0.38 ± 0.19	2.90 ± 0.34	1.95 ± 0.18	1.48 ± 0.34	0.01 ± 0.00
0.88 ± 0.02	0.61 ± 0.03	1.46 ± 0.04	0.11 NA	1.93 ± 0.09	1.04 ± 0.08	0.34 ± 0.09	0.01 ± 0.00
1.06 ± 0.21	0.87 ± 0.05	1.29 ± 0.11	0.39 NA	2.40 ± 0.21	1.53 ± 0.10	1.49 ± 0.24	0.01 ± 0.00
0.59 ± 0.11	0.58 ± 0.13	1.15 ± 0.20	0.30 ± 0.13	1.68 ± 0.30	1.13 ± 0.25	1.38 ± 0.15	0.01 ± 0.00
0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.58 ± 0.06	0.35 ± 0.02	0.64 ± 0.05	0.00 ± 0.00

3 Résultats

3.1 Site de Cergy

3.1.1 *Composition chimique et état de saturation des solutions*

Le Tableau III.III présente les données géochimiques du compartiment dissous pour le site de Cergy. L'ensemble des échantillons ont une balance des charges comprise entre -4,5 et -2,2 %, ce qui montre la cohérence des mesures par ICP-AES pour les cations versus les mesures par différentes méthodes pour les anions.

L'évolution temporelle de la température et du pH se divise en deux périodes : (i) une période chaude (entre 06/06 et 15/09), avec des températures entre 20,6 et 23,9 °C et des pH élevés entre 8,8 et 9,1, et (ii) une période froide (29/09 au 20/10), avec des températures entre 14,7 et 18,9 °C et des pH plus faibles entre 7,9 et 8,4 (Figure 3.4A).

Les mesures de la teneur en P total ainsi que la teneur en chlorophylle-a (chl-a) nous renseignent sur l'état trophique des eaux. Pour l'étang des Galets (Cergy), la teneur en P dissous était en deçà de la limite de détection de l'ICP-AES, le P total n'est donc basé que sur la fraction particulaire (Tableau III.IV). La teneur en P total variait entre 5,3 et 17,5 µg/L, et la chl-a oscille entre 5,7 et 17,4 µg/L (Figure 3.5A). Par ailleurs nous avons aussi analysé en colorimétrie les ions PO_4^{3-} sur la fraction dissoute (< 0,2 µm) en colorimétrie (Tableau III.III). De façon consistante avec les mesures en ICP, pour toutes les dates sauf une (15/09) la teneur en ions PO_4^{3-} était en deçà des limites de détection. Au total, l'eau de l'étang des Galets oscillait donc entre un état mésotrophe et eutrophe selon les dates.



Figure 3.4 Variation du pH (gris) et de la température (noir) en fonction du temps sur pour (A) l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil) et (B) l'étang des Galets (Cergy).

Les espèces azotées ont été également mesurées, mais uniquement sur la fraction dissoute ($< 0,2 \mu\text{m}$). Les concentrations en ions nitrites (NO_2^-) et en ions nitrates (NO_3^{2-}) étaient en deçà des limites de détection pour tous les échantillons. La concentration en ions ammonium (NH_4^+) variait entre 0,4 et 8,3 μM (soit 7 et 200 $\mu\text{g/L}$) (Figure 3.6). On notera que l'absence de mesure du N particulaire ne permet pas une interprétation complète de la dynamique des espèces azotées dans nos milieux.

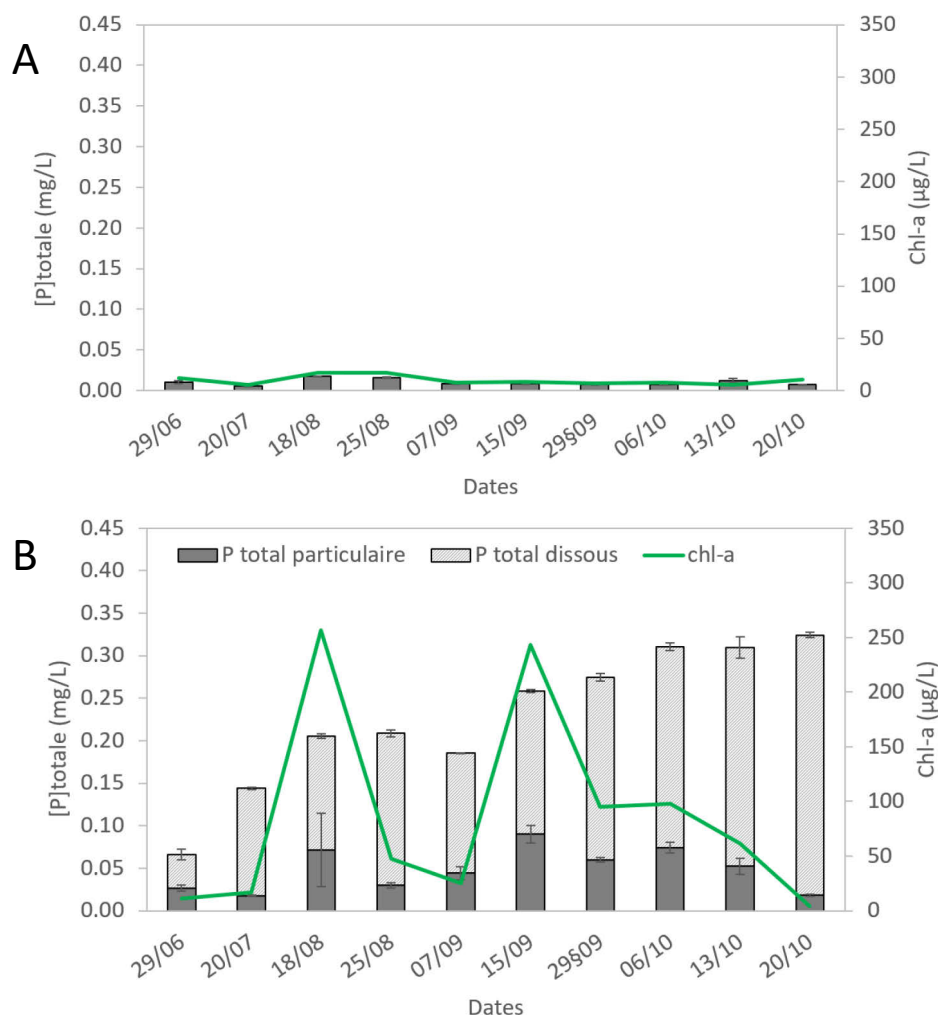


Figure 3.5 Variation du P total et de la chlorophylle-a (vert) en fonction du temps pour (A) l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil) et (B) l'étang des Galets (Cergy). Le P total est séparé en une fraction dissoute ($< 0,22 \mu\text{m}$) en orange et particulaire ($> 0,22 \mu\text{m}$) en bleu. Les barres d'erreur proviennent de mesures sur trois répliques techniques.

La teneur en calcium dissous (Figure 3.7) variait entre 560 et 845 μM , avec une forte augmentation entre le 15 septembre (623 μM) et le 10 octobre (881 μM) pour le site de Cergy (Figure 3.7). La nature chimique des eaux a été caractérisée comme une eau alcalino-terreuse avec une proportion importante de Ca^{2+} et le DIC comme ions dominants, en réduisant la composition aux ions majeurs : Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4 , DIC et en les projetant dans des systèmes ternaires $(\text{HCO}_3+\text{CO}_3)\text{-SO}_4\text{-Cl}$ et Ca-Mg-(Na+K), et quaternaire $(\text{HCO}_3+\text{CO}_3)\text{-(SO}_4\text{+Cl)-(Ca+Mg)-(Na+K)}$ (Figure 3.8). En parallèle, on observe un enrichissement relatif en calcium et en bicarbonate au cours du temps (Figure 3.9A).

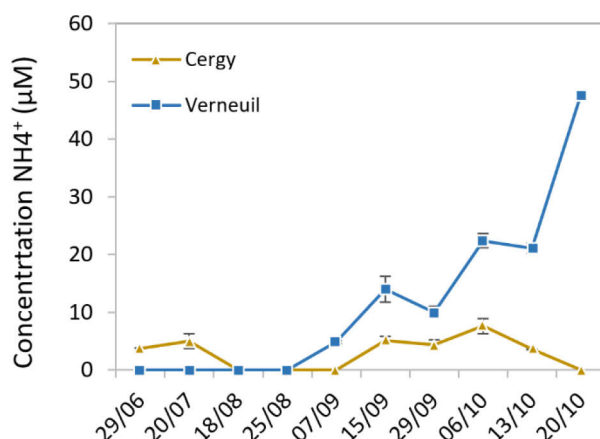


Figure 3.7 Variation de l'ammonium dissous (NH_4^+) (< 0,22 μm) en fonction du temps sur pour l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil) en bleu et l'étang des Galets (Cergy) en jaune. Les barres d'erreur proviennent de mesures sur trois répliques techniques.

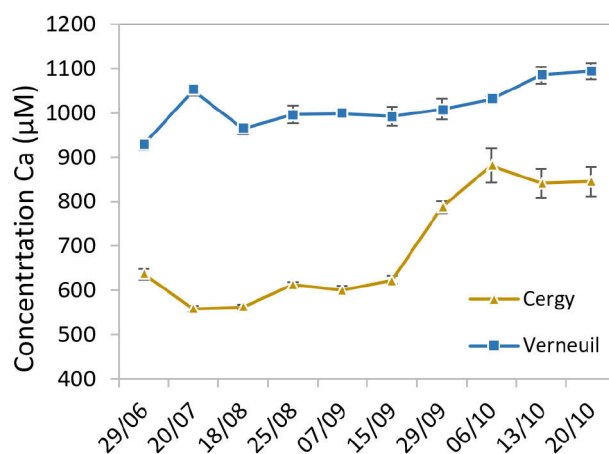


Figure 3.6 Variation du calcium dissous (Ca^{2+}) (< 0,22 μm) en fonction du temps sur pour l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil) en bleu et l'étang des Galets (Cergy) en jaune. Les barres d'erreur proviennent de mesures sur trois répliques techniques.

L'évolution de la saturation des eaux par rapport à différentes phases carbonatées (Figure 3.10A) indique un état sursaturé par rapport à l'aragonite et à la calcite tout au long de l'étude sauf pour deux dates (29/09 et 06/10), où les eaux sont sursaturées vis-à-vis de la calcite mais sous-saturées vis-à-vis de l'aragonite. On observe une tendance générale à une diminution de l'état de saturation au cours du temps, avec une corrélation significative entre la diminution de l'activité des ions CO_3^{2-} et la diminution du pH ($R^2 = 0,997$, $p\text{-value} = 4,15^{-09}$, Figure 3.11A, Figure S3.1A), et entre la diminution du pH et l'augmentation de l' $a(\text{Ca}^{2+})$ ($R^2 = 0,843$, $p\text{-value} = 0,0239$, Figure 3.11B, Figure S3.1A). On observe que les points de la période chaude (06/29 au 15/09) sont regroupés sur la ligne de saturation de l'ACC de Kellermeier *et al.* 2014 et de la monohydrocalcite (Figure 3.9A). Les points de la période froide (29/09 au 20/10) sont situés en dessous de la ligne de saturation de l'ACC et de la monohydrocalcite. Les dates du 29/09 et 06/10 présentent les états de saturation les plus faibles, en dessous de la ligne de saturation de l'aragonite et proches de celle de la calcite.

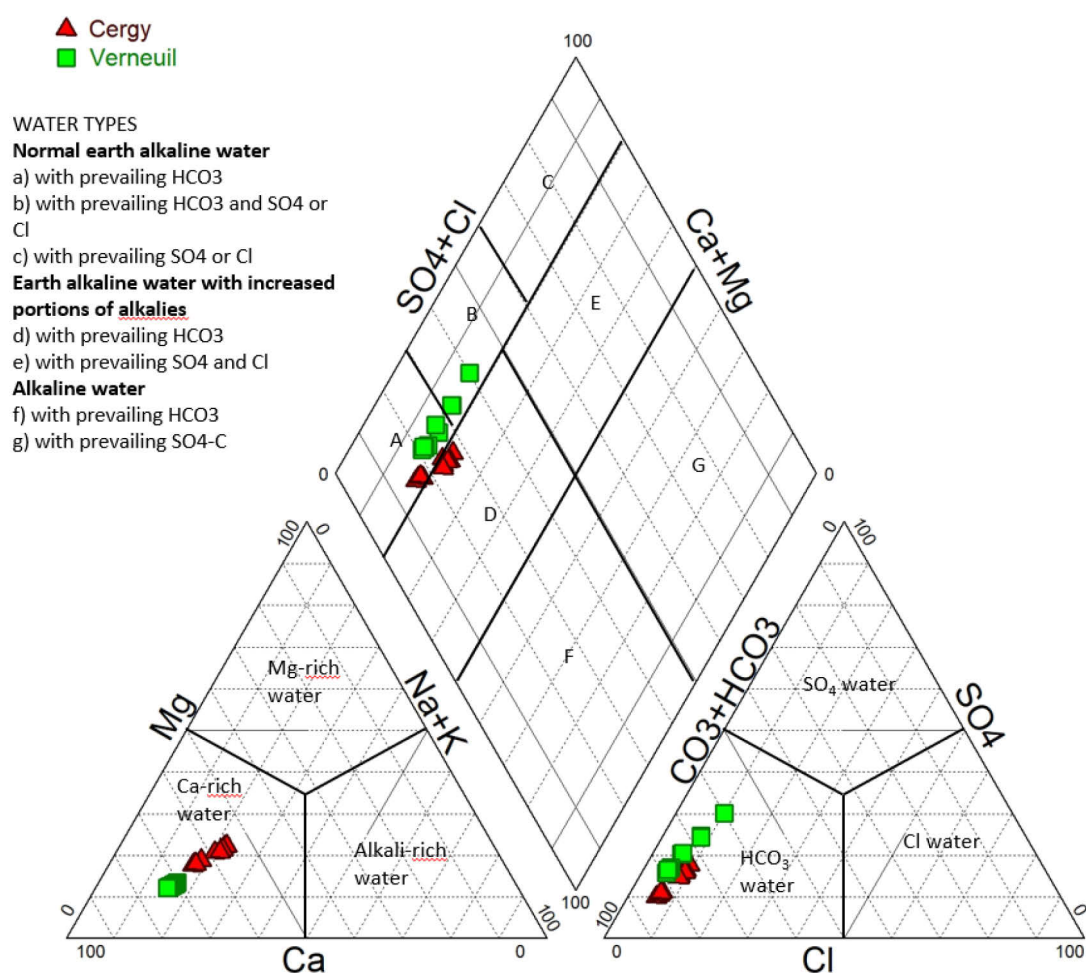


Figure 3.8 Représentation dans les systèmes ternaires $(\text{HCO}_3+\text{CO}_3)\text{-SO}_4\text{-Cl}$ et Ca-Mg-(Na+K) et quaternaire $(\text{HCO}_3+\text{CO}_3)\text{-(SO}_4+\text{Cl})\text{-(Ca+Mg)-(Na+K)}$ des eaux de Verneuil et Cergy (Compartiment dissous $< 0,22 \mu\text{m}$)

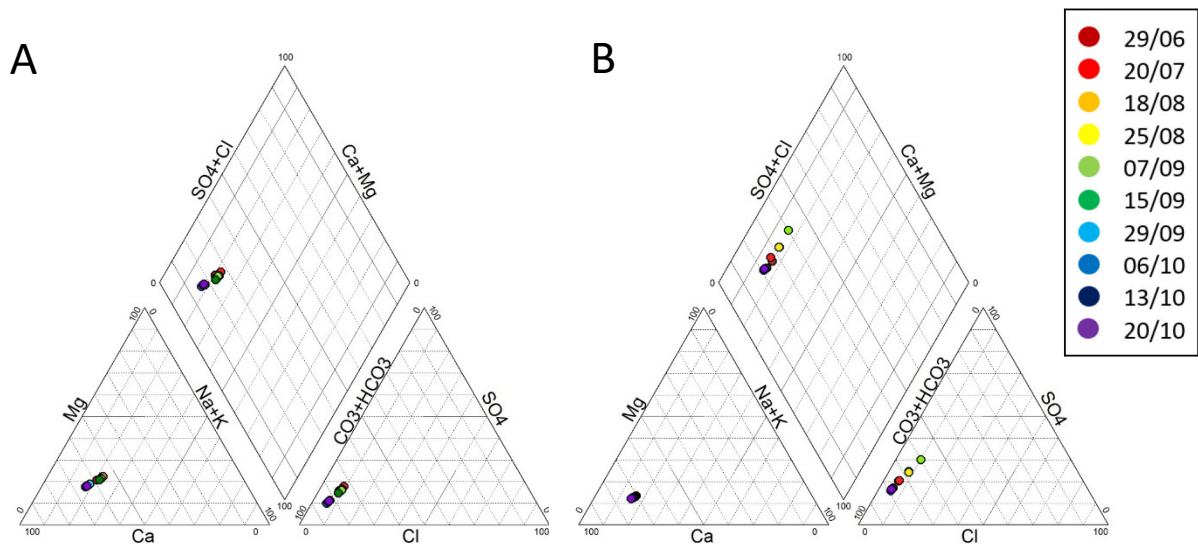


Figure 3.9 Evolution chimique des eaux de (A) l'étang des Galets (Cergy) et (B) l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil) dans une représentation dans les systèmes ternaires $(\text{HCO}_3+\text{CO}_3)\text{-SO}_4\text{-Cl}$ et Ca-Mg-(Na+K) et quaternaire $(\text{HCO}_3+\text{CO}_3)\text{-(SO}_4+\text{Cl})\text{-(Ca+Mg)}\text{-(Na+K)}$. (Compartiment dissous < 0,22 μm)

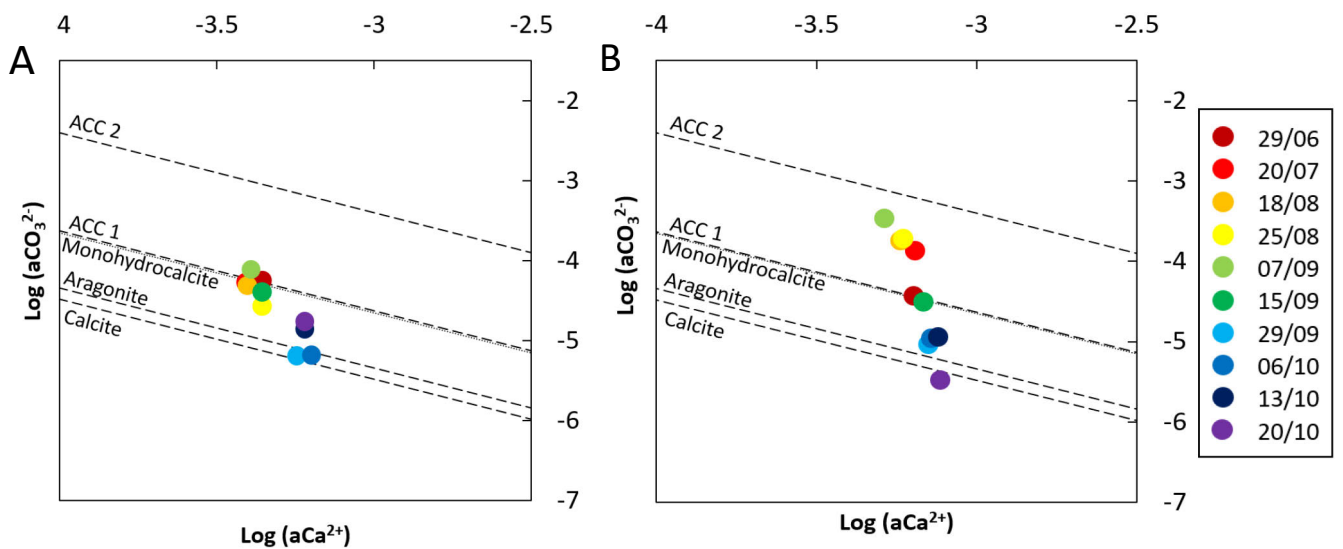


Figure 3.10 Diagramme de solubilité dans l'espace $\text{log}(a\text{CO}_3^{2-})$ en fonction du $\text{log}(a\text{Ca}^{2+})$ pour le site de (A) Cergy et (B) Verneuil. Les solubilités de la calcite et de l'aragonite ont été définies par Plummer et Busenberg (1982) (63), celle de la monohydrocalcite par Zeyen et al.(2021) (64), celle de l'ACC1 par Kellermeier et al. (2014) (23) et celle de l'ACC2 par Brečević et Nielsen (1989) (65).

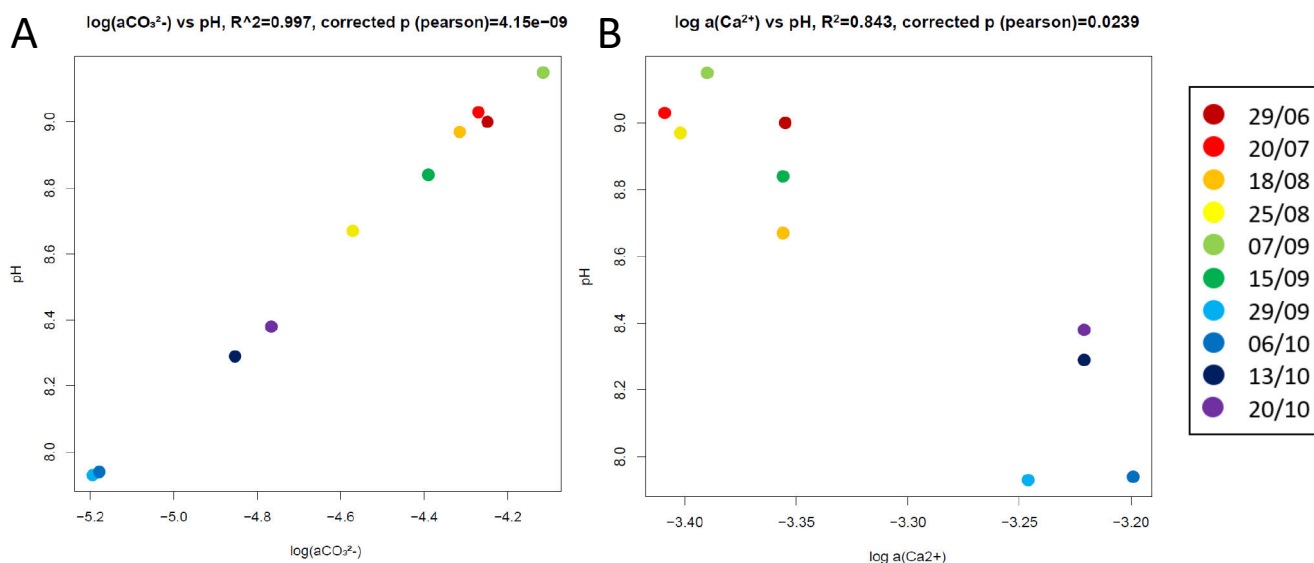


Figure 3.11 Evolution du pH en fonction de (A) $\log(a(\text{CO}_3^{2-}))$ et (B) $\log a(\text{Ca}^{2+})$ pour le site de Cergy

3.1.2 Composition chimique de la matière particulaire (ATR-FTIR et ICP-AES)

La figure 3.10 montre les spectres en ATR-FTIR dans l'infrarouge (IR) moyen pour la matière en suspension du site de Cergy. Les spectres ont été annotés par comparaison avec la littérature (tableau III.V). La présence ou l'absence pour chaque spectre des différents pics identifiés sont données dans le tableau SIII.II. Les signatures spectrales de fonctions chimiques présentes dans les cellules (protéines, lipides, etc.) sont présentes à toutes les dates (figure 3.12). Certaines bandes, présentes sur tous les spectres, (bandes 16 à 18 ; $1077 - 1035 \text{ cm}^{-1}$) peuvent être dues à la présence de polyphosphates et/ou de silice amorphe, cette dernière étant vraisemblablement associée aux diatomées (Figure 3.15D-I, Figure S3.1). Les phases cristallines et amorphes de carbonates de calcium ont des bandes d'absorption caractéristiques situées dans la région spectrale entre 900 et 700 cm^{-1} , qui n'interfèrent pas (ou peu) avec des pics de la matière organique (32) (Figure 3.12C). Les bandes caractéristiques de la calcite à environ 712 cm^{-1} et 872 cm^{-1} sont visibles pendant les deux périodes, sur les échantillons de Cergy du 29 juin au 06 octobre, avec une diminution de l'intensité de pic au cours du temps. On notera deux dates (07/09 et 06/10) avec un pic très faible à 872 cm^{-1} , et aucun pic à 712 cm^{-1} . Aucune bande caractéristique des ACC à 860 cm^{-1} n'est détectée.

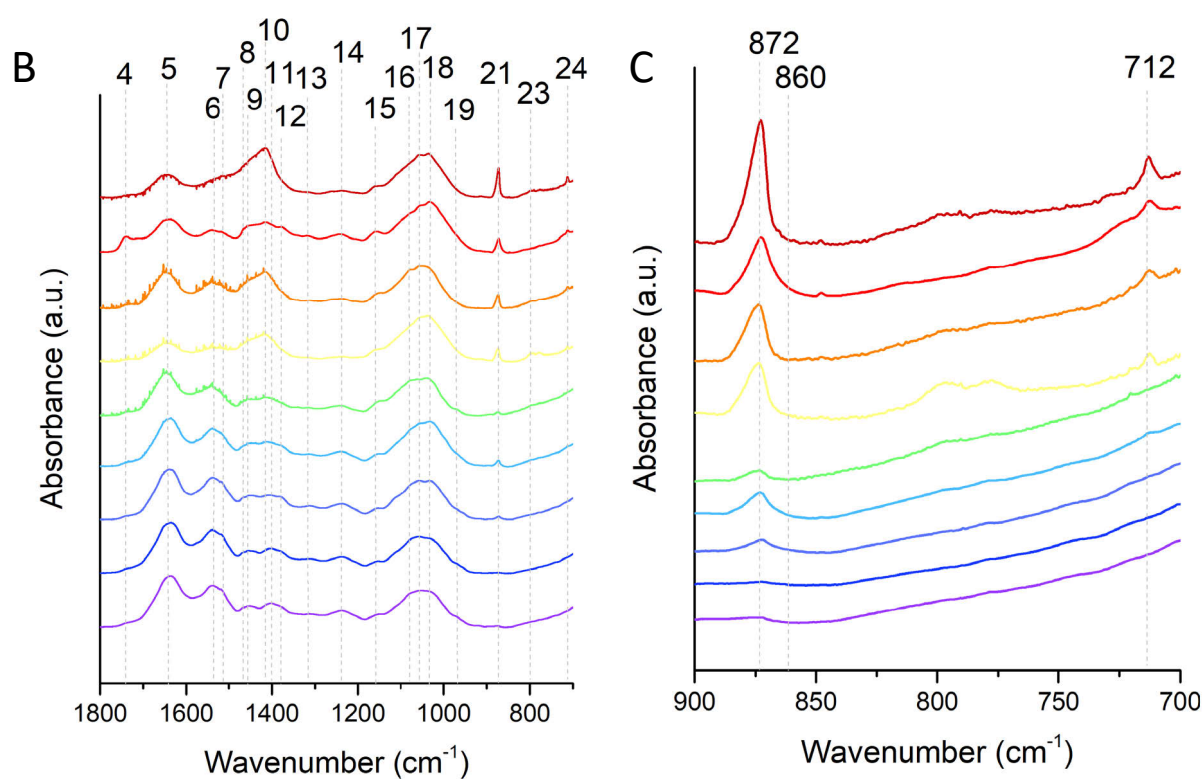
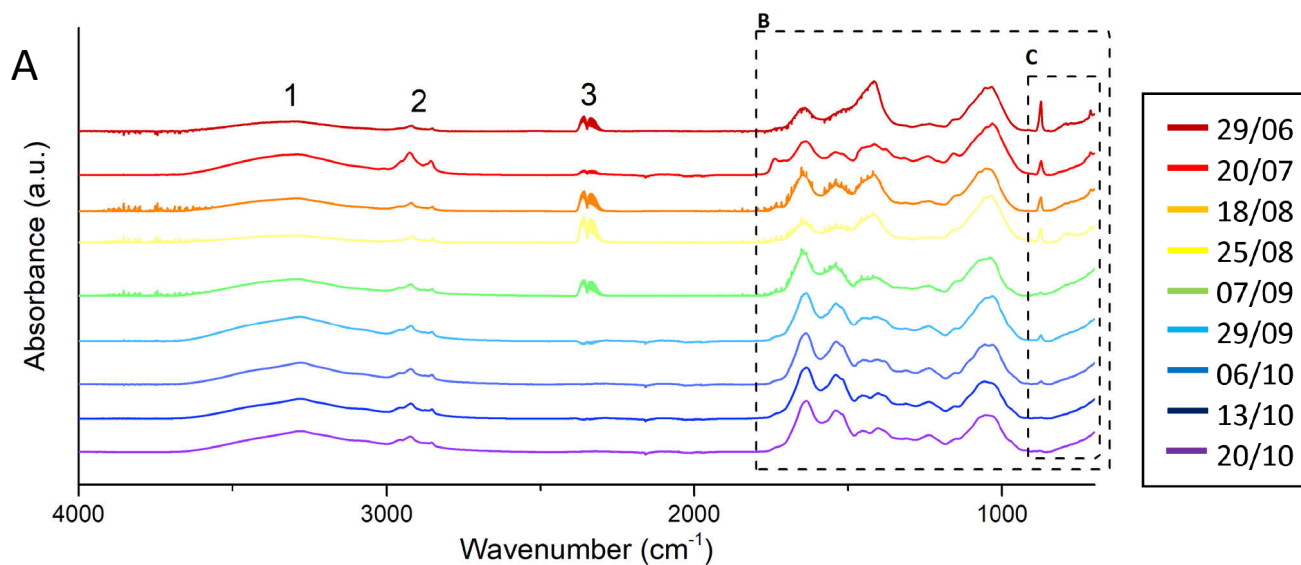


Figure 3.12 Spectres d'absorption ATR-FTIR des échantillons de l'étang des Galets (Cergy) dans l'IR moyen. L'insert 1 montre un zoom de la région entre 1800 et 900 cm^{-1} . Les numéros sur les spectres correspondent aux numéros de bande et leur attribution est fournie dans le tableau III.V. Les lignes grises en tirets sont des lignes directrices pour faciliter l'identification de la position des bandes. L'insert 2 montre un zoom de la région entre 900 et 700 cm^{-1} où l'on trouve les caractéristiques spectrales discriminantes des carbonates de calcium.

Tableau III.V. Assignements et position des pics des spectres obtenus pour le site de Cergy. ν = étirement symétrique, ν_{as} = étirement asymétrique, δ = déformation symétrique (courbure), δ_{as} = déformation asymétrique (courbure).

Bande index	Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment	Comments	References
1	3279	Water		Mehta <i>et al.</i> 2022 (32)
2	2960-2856	C-H N vibration of methyl and methylene groups (lipids)		Kansiz <i>et al.</i> 1999 (44) ; Murdock & Wetzel 2009 (45)
3	2353	CO ₂		Mehta <i>et al.</i> 2022 (32)
4	1740	ν C=O of ester functional groups primarily from lipids and fatty acid		Kansiz <i>et al.</i> 1999 (44) ; Murdock & Wetzel 2009 (45)
5	1640	ν C=O of amides associated with proteins	amide I band	Kansiz <i>et al.</i> 1999 (44) ; Murdock & Wetzel 2009 (45)
6	1540	d N-H of amides associated with proteins	amide II band	Kansiz <i>et al.</i> 1999 (44) ; Murdock & Wetzel 2009 (45)
7	1515	not found		
8-9	1467-1456	δ_{as} CH ₃ and δ_{as} CH ₂ of proteins		Kansiz <i>et al.</i> 1999 (44)
10	1415	not found		
11	1400	not found		
12	1376	δ CH ₃ , δ CH ₂ / δ C-O of proteins, carboxylic groups		Murdock & Wetzel 2009 (45)
13	1315	ν C H, δ N H of proteins		Murdock & Wetzel 2009 (45)
14	1237	ν_{as} P=O of nucleic acids, phosphoryl group	DNA/RNA, phosphore related proteins and PolyP storage	Murdock & Wetzel 2009 (45)
15	1160	ν C-O-C/ ν_{as} P=O		Murdock & Wetzel 2009 (45)
16-18	1077 - 1035	ν C-O-C/ ν_{as} P=O/ Silica		Murdock & Wetzel 2009 (45)
19	963	P-O-P of polyphosphate / ν C-O-C/ ν_{as} P=O		Murdock & Wetzel 2009 (45)
20	896	not found		
21	872	out-of-plane bending of carbonates in calcite (ν 2)		Mehta <i>et al.</i> 2022 (32)
22	860	out-of-plane bending of carbonates in ACC (ν 2)		Mehta <i>et al.</i> 2022 (32)
23	795- 778	not found		
24	712	Calcite		Mehta <i>et al.</i> 2022 (32)

Nous avons analysé les données de chimie élémentaire (ICP-AES) de la matière particulaire du site de Cergy (Tableau III.IV). La composition chimique du particulaire varie en fonction des échantillons et nous pouvons analyser ces variations en les interprétant comme le résultat de mélanges de différentes phases en différentes proportions. Pour émettre des suggestions sur la nature de ces phases, nous avons projeté ces compositions chimiques dans différents ternaires et interprétons certaines tendances comme des mélanges entre différentes phases. Nous notons que la comparaison avec les données du site Verneuil nous a permis de favoriser certaines des hypothèses émises ci-dessous.

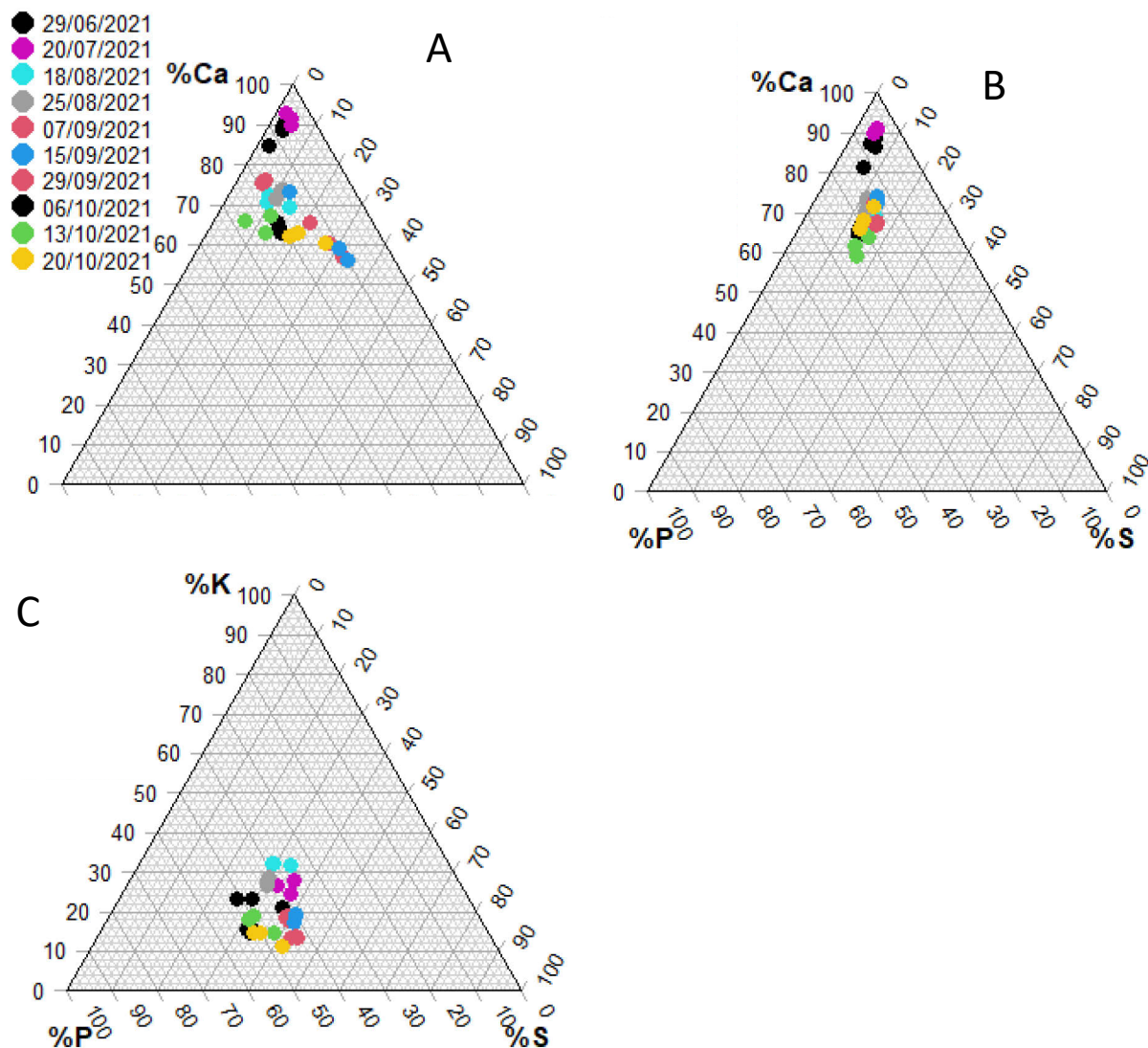


Figure 3.13 Analyse de la composition chimique élémentaire du particulaire (>0,22 μm) de l'étang des Galets (Cergy). (A) Représentation dans les systèmes ternaires (A) Ca-P-Si, (B) Ca-P-S et (C) K-P-S. Les points correspondent aux trois triplicats biologiques

Avant tout, nous constatons qu'à cette échelle globale, l'aluminium est relativement négligeable devant le calcium et le phosphore, suggérant que des phases silicatées détritiques comme des argiles alumineuses ne contribuent pas significativement à la spéciation du Ca. Dans le ternaire Ca-P-Si (Figure 3.13A), nous observons un regroupement de nombreux points autour d'une composition molaire Ca :P :Si d'environ 70 :20 :10. Certains points tendent vers le pôle Ca (29/06 et 20/07), possiblement liés à un enrichissement en phases de carbonates de calcium. D'autres tendent vers le pôle Si (15/09) suggérant un enrichissement en Si, possiblement lié aux diatomées. Dans le ternaire Ca-P-S (Figure 3.13B), nous observons que les points se regroupent en 2 paquets principalement. L'un proche du pôle Ca, l'autre du joint P-S. De manière cohérente avec l'interprétation de la figure 3.13A, cette variabilité peut être interprétée comme le résultat d'une proportion variable dans le particulaire de matière organique (joint P-S) et carbonates de calcium (calcite, ACC et/ou calcite magnésienne ; pôle Ca) avec un maximum de carbonates de calcium le 29/06 et le 20/07 conformément aux autres analyses du solide. D'après cette ligne de mélange, l'on peut en déduire un rapport molaire P/S d'environ 1,5 dans la matière organique. Dans le ternaire K-P-S (Figure 3.13C), on observe que tous les points se regroupent au même endroit et nous interprétons cela comme le fait que ces 3 éléments sont principalement portés par la biomasse dans ce système. Là encore nous pouvons déduire la stœchiométrie suivante P:S :K comme 46 % :34 % :20 %.

3.1.3 Spéciation du Ca de la matière particulaire (XANES)

La figure 3.14 montre les spectres XANES normalisés au seuil du Ca (A) ainsi que les dérivées de ces spectres d'absorption (B) pour les dates du 29 juin, 18 août, 25 août et 15 septembre, ainsi que pour la calcite de référence. Les spectres du 29 juin au 25 août présentent une forme similaire : dans l'espace dérivatif, on distingue d'abord deux pics pré-seuil de faible intensité à 4039,5 et 4040,8 eV, à l'image du spectre de la calcite. Deux pics, à 4043,4 eV et 4044,4 ont une position et une morphologie similaires à celles de pics de la calcite. Toutefois, le premier pic à 4043,4 eV est moins prononcé que celui de la calcite situé à la même énergie. De nouveau, un pic situé à 4047,4 eV, présent également à cette énergie sur le spectre de la calcite, et décalé par rapport à celui de l'ACC et de l'hydroxyapatite, est présent sur les trois spectres, mais avec une intensité plus importante que pour la calcite. Le spectre de l'échantillon du 09 septembre diffère des trois premiers spectres. Ici, on retrouve un pic pré-seuil prononcé vers 4040 eV, présent dans les spectres de l'ACC et de l'hydroxyapatite, et absent dans la calcite. On retrouve deux pics à 4043,5 eV et 4044,8 eV, mais avec le second pic plus prononcé. On retrouve un pic à 4048 eV, décalé par rapport au pic à 4047,4 eV des trois premiers spectres. Un léger épaulement est présent à 4049,3 eV.

Afin de préciser ces premières observations qualitatives, nous avons utilisé un ajustement des spectres par combinaison linéaire (LCF). Plusieurs composants (spectres de références) ont été utilisés : des phases minérales de référence comme (1) la calcite, (2) la calcite magnésienne, et (3) l'hydroxyapatite ; pour modéliser la part du Ca compris dans la

biomasse, (4) une souche de *Microcystis* formatrice d'iACC (PMC 827), et (5) une souche de *Microcystis* ne formant pas d'iACC (PMC 568). Les résultats de l'ajustement sont présentés dans le Tableau III.IV. Les résultats d'ajustement représentés sur la Figure 3.14B sont ceux présentant les R-factors les plus bas (en gras dans le tableau III.VI). A chaque date, une part du Ca total était affiliée à de la calcite, entre 21 et 60 % du Ca total. Pour les dates du 06 juin au 25 août, entre 26 et 48 % du Ca total étaient affiliés à de la calcite magnésienne. Pour les dates du 29 juin au 25 août, le R-factor n'était pas significativement amélioré (< 10 % de changement de valeur) en utilisant le spectre de la souche iACC+ de *Microcystis* (PMC 827) au lieu de la souche iACC- de *Microcystis* (PMC 568) pour modéliser la biomasse, et inversement. Il est donc difficile de déterminer si des souches formant des iACC étaient présentes ou non dans nos échantillons avec cette technique). La biomasse représente 10 à 20 % de la contribution totale au réservoir du calcium pour ces dates. Pour la date du 15 septembre, l'utilisation de la souche de *Microcystis* iACC- (PMC 568) pour modéliser la biomasse à la place de la souche iACC+ (PMC 827) améliorerait les scores d'ajustement de plus de 10 %. Ainsi, si les souches iACC+ étaient présentes dans nos échantillons, leur contribution à la spéciation globale du Ca particulaire est sous le seuil de détection. La biomasse représentait ici 70 % du réservoir total de calcium, et 8 % du Ca total ont été affiliés à de l'hydroxyapatite. Enfin, 19 % de la contribution au calcium sont affiliés à une phase non identifiée dans cette analyse.

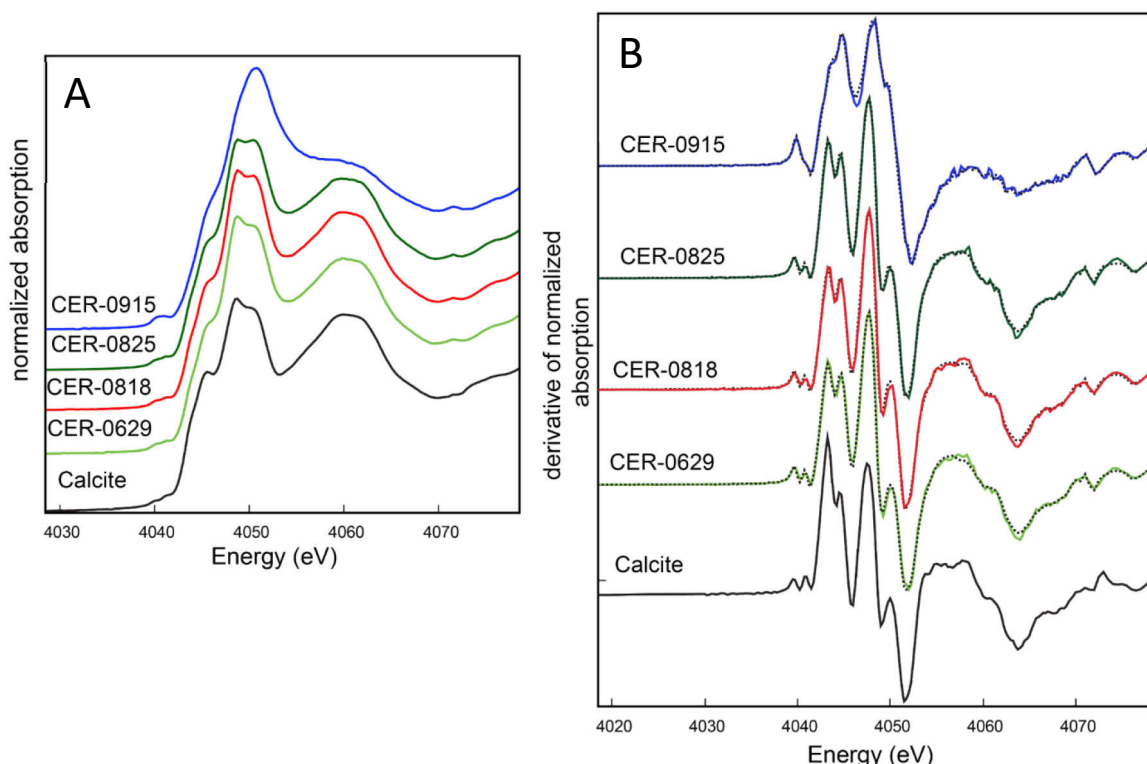


Figure 3.14 (A) Spectres XANES normalisés de la matière en suspension de l'étang des Galets (Cergy) et de calcite. (B) Spectres XANES dérivés de la matière en suspension de l'étang des Galets (Cergy) et de calcite. Les lignes pleines représentent les données expérimentales et les lignes pointillées les résultats de la méthode LCF

Tableau III.VI Valeurs de la contribution des différentes phases de référence dans l'ajustement des spectres XANES par combinaisons linéaires pour le site de Cergy. Pour chaque date, l'ajustement représenté sur la figure 3.14 est surligné en gris.

	PMC827 (iACC+)	PMC 568 (iACC-)	Calcite magnésienne	Hydroxyapatite	Calcite	R-factor
29/06		10	48		42	0.0047526
	9		51		40	0.0049594
18/08		15	25		60	0.0053306
	14		29		56	0.0054414
25/08		20	26		54	0.0025935
	18		32		50	0.0035825
15/09		70		8	21	0.0039637
	73			8		0.0260405

3.1.4 Analyses MEB et MET de la matière particulaire

Le compartiment particulaire (> 0,22 µm) a été observé en microscopie électronique à balayage (MEB), et en microscopie électronique en transmission à balayage (STEM). Pour chaque date, un ensemble de cellules de micro-organismes et de précipités minéraux, en quantités variables, ont pu être observés.

Plusieurs objets de nature différente montraient une composition chimique riche en Ca : des précipités riches en Ca uniquement, sans phosphore ou soufre associé (Figure 3.15G-I spectre 2), ont été interprétés comme une phase minérale de CaCO₃ ainsi que des précipités riches en Ca et Mg, interprétés comme de la calcite magnésienne (Figure 3.15A-C spectre 1 ; Figure 3.15E-F Spectre 2). De plus, des tests entiers ou partiels d'une algue unicellulaire, *Phacotus* sp., composés d'une phase cristalline de CaCO₃, étaient présents à 7 dates sur 10 (Figure 3.16 et Tableau III.VII). Le nombre d'individus par mL d'eau a été estimé à partir des échantillons passés au MEB (Tableau III.VII). Pour chaque date, des frustules de diatomées, entières ou partielles, ont été observées (Figure 3.15D-F spectre 1 ; Figure 3.15G-I spectre 1). Enfin d'autres phases contenant un ou plusieurs éléments parmi Si, P, Mg, Mn, Al et Fe ont été observées mais ne sont pas détaillées ici (Figure S3.1).

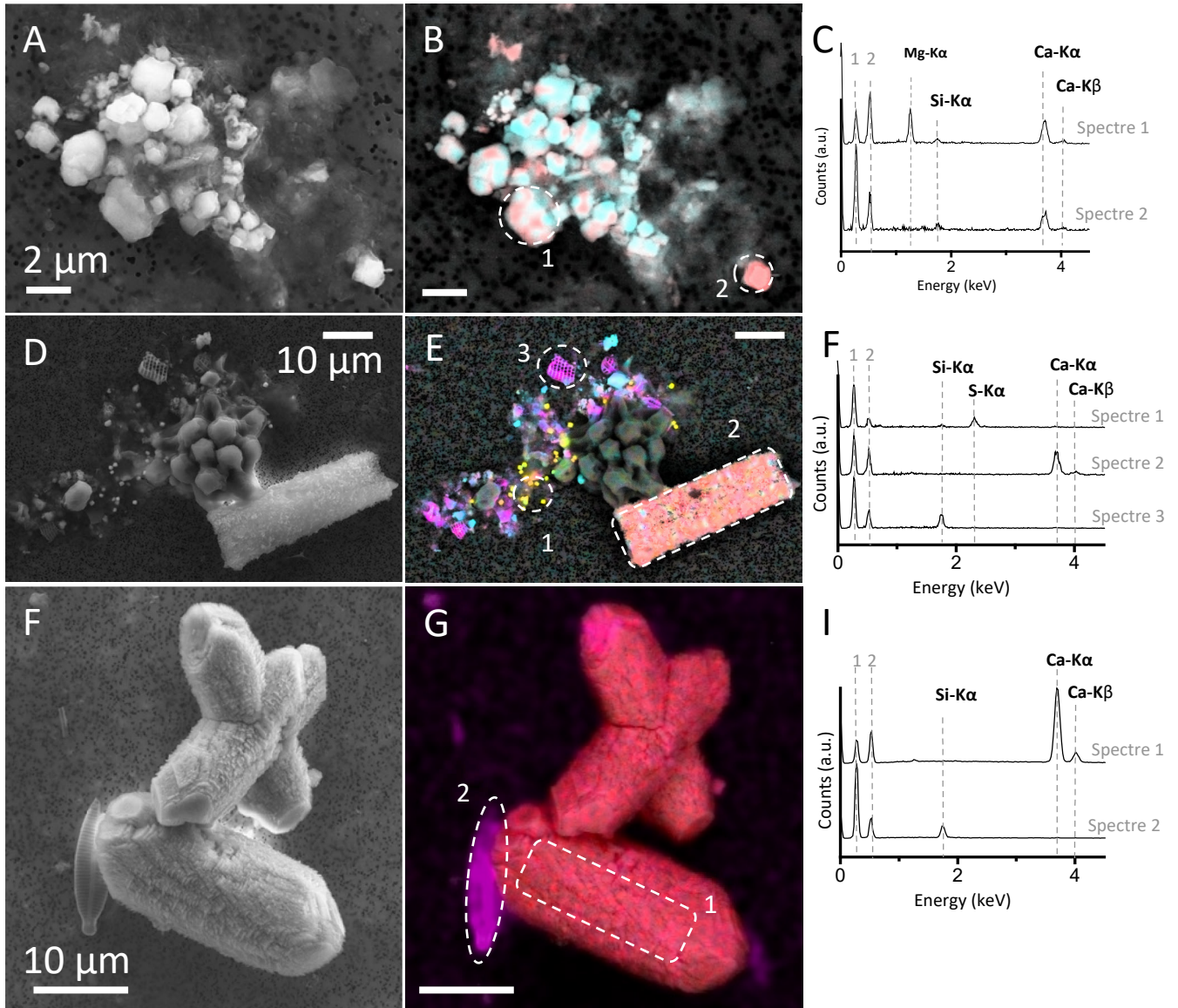


Figure 3.15 Analyses par microscopie électronique à balayage (MEB) représentatives de la diversité des phases riches en Ca l'étang des Galets (Cergy). (A) Image MEB en mode de détection SE2 (B) Superposition correspondante de l'image AsB et des cartes MEB-EDX du Ca (rouge), Si (rose), Mg (cyan) et S (jaune). (C) Spectres de rayons X à dispersion d'énergie (EDXS) correspondants aux encarts 1 et 2 dans l'image B. (D à I) Données du même type pour deux autres phases riches en Ca. Les étiquettes des lignes d'émission dans les spectres EDXS sont : (1) : C K α et (2) O K α .

Tableau III.VII. Proportion de *Phacotus* en nombre d'individus par mL d'eau de lac observés en MEB pour les deux sites étudiés. Pour le site de Verneuil, les individus n'ont pas été dénombrés et nous donnons ici une indication qualitative sur leur présence/absence.

Date	Site de Cergy	Site de Verneuil
29/06/2021	62 ± 18	oui
20/07/2021	134 ± 39	oui
18/08/2021	5 ± 4	oui
25/08/2021	8 ± 4	oui
07/09/2021	30 ± 9	oui
15/09/2021	11 ± 2	Pas de phacotus
29/09/2021	0 ± 0	Pas de phacotus
06/10/2021	ND	oui
13/10/2021	0 ± 0	oui
20/10/2021	2 ± 1	Pas de phacotus

Un intérêt particulier a été porté à la présence et à la nature chimique des inclusions intracellulaires dans les cyanobactéries. Ainsi, deux types d'inclusions ont pu être identifiées : (i) Des inclusions composées majoritairement de P, avec parfois des cations comme le Mg, le K ou le Ca, interprétées comme des granules de polyphosphates (polyP) (Figure S3.2, 3.17E-H) et (ii) des inclusions riches en Ca et contenant peu à pas de P, interprétées comme des ACC (Figure 3.17A-D). Des polyP ont été observés dans différents organismes dont *Microcystis*, et ce à toutes les dates (Figure 3.17E-H, Figure S3.2). Les iACC ont été observés uniquement dans des cellules identifiées morphologiquement comme appartenant au genre *Microcystis*, et ce pour 7 dates sur 10 (Voir Tableau III.VIII).

Tableau III.VIII Observations d'au moins une cellule de *Microcystis* formant des iACC par MEB ou MET pour les deux sites étudiés.

Date	Site de Cergy	Site de Verneuil
29/06/2021	Non	Oui
20/07/2021	Oui	Oui
18/08/2021	Non	Oui
25/08/2021	Oui	Oui
07/09/2021	Oui	Oui
15/09/2021	Oui	Oui
29/09/2021	Non	Non
06/10/2021	Oui	Oui
13/10/2021	Oui	Non
20/10/2021	Oui	Non

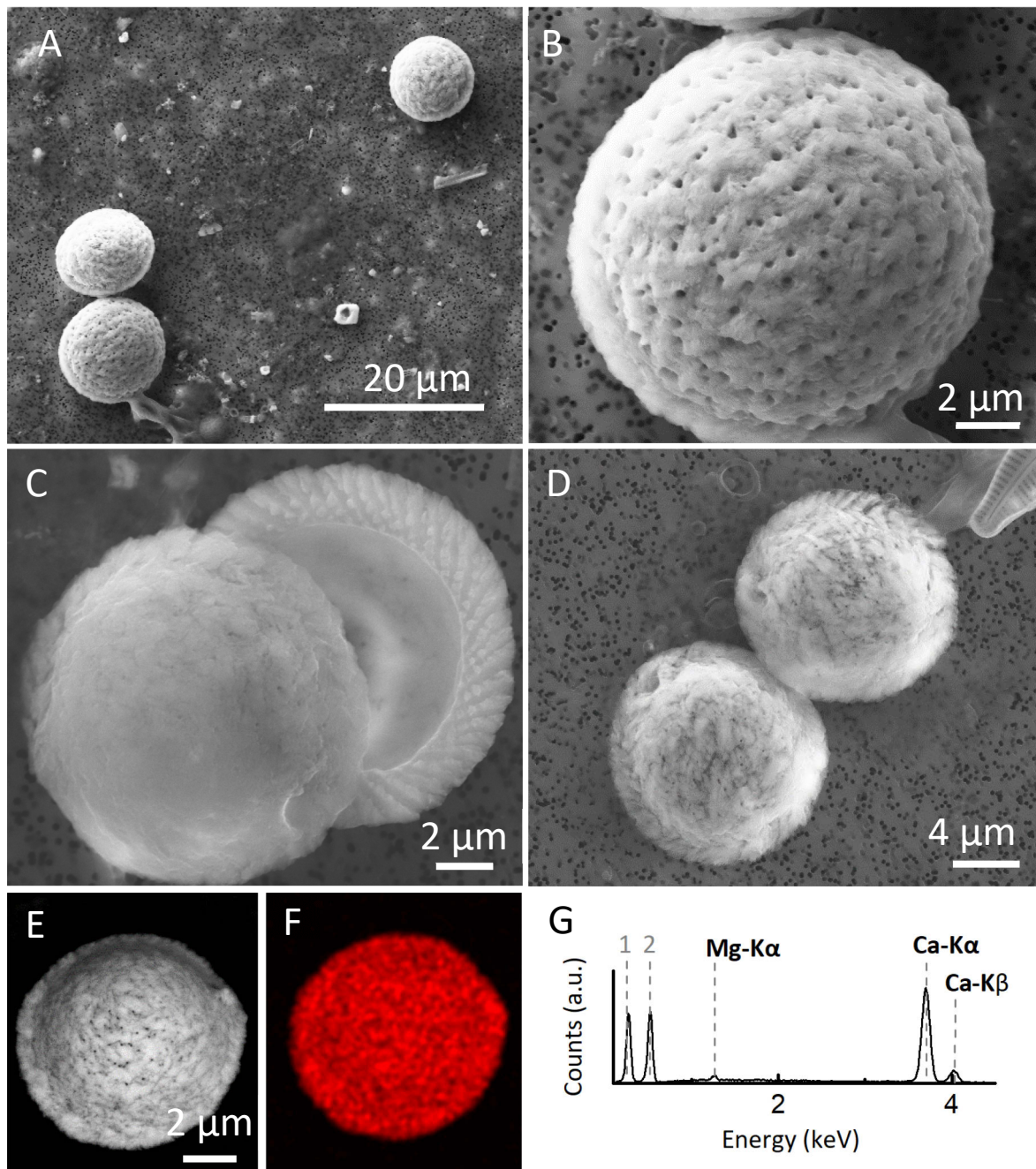


Figure 3.16 Analyses MEB d'échantillons provenant de l'étang des Galets (Cergy) de tests entiers ou partiels de *Phacotus* sp. (A à D) Images MEB en mode de détection SE2 (E) Image MEB en mode AsB (F) Superposition correspondante de l'image AsB et de la carte MEB-EDX du Ca (rouge) (C) Spectre de rayons X à dispersion d'énergie (EDXS) correspondant à F. (H) Concentration du nombre d'individus de *Phacotus* au cours du temps. Les étiquettes des lignes d'émission dans les spectres EDXS sont : (1) : C Kα et (2) O Kα.

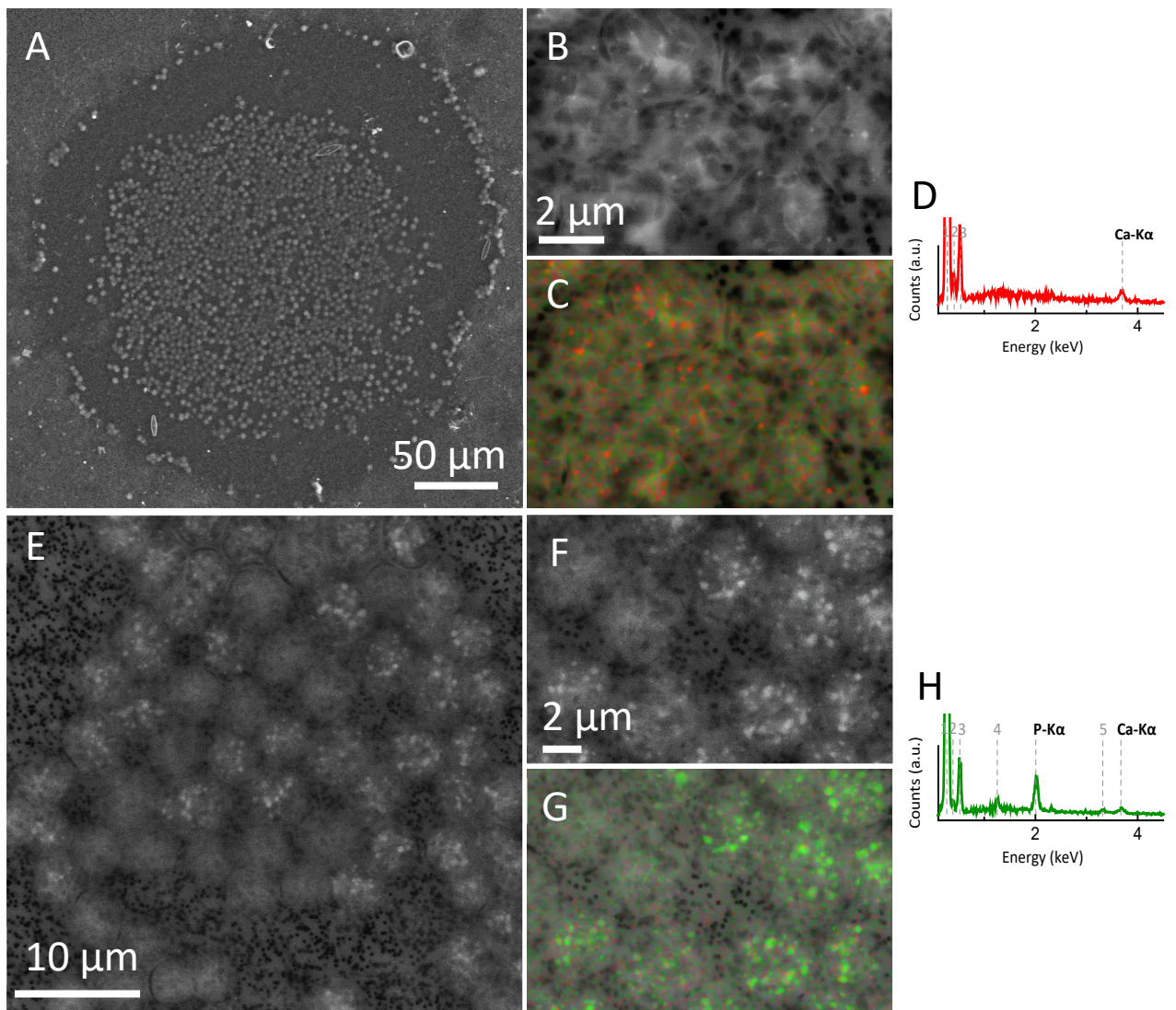


Figure 3.17 Analyses MEB de *Microcystis* formant des granules iACC et PolyP dans l'étang des Galets (Cergy) (A) Image MEB en mode de détection MEB de cellules de *Microcystis* formant des iACC. (B) Images MEB en mode de détection AsB d'une vue rapprochée des cellules de *Microcystis*. (C) Superposition correspondante de l'image AsB et des cartes SEM-EDX de Ca (rouge) et P (vert). Les iACC apparaissent en rouge et les granules de PolyP en vert. (D) Spectre EDXS des granules de iACC (points rouges). (E-H) : données du même pour des cellules formant uniquement des polyP. Les étiquettes des lignes d'émission dans les spectres EDXS sont : (1) : C K α ; (2) N K α ; (3) O K α ; (4) Al K α ; (5) K K α .

3.1.5 Dynamique des populations de *Microcystis*

Le comptage en microscopie optique permet d'évaluer les proportions relatives des cyanobactéries, dont *Microcystis*, et des microalgues. La chlorophylle-a sert ici de proxy pour quantifier la biomasse chlorophyllienne. Le taux de chlorophylle-a varie entre 5.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (20/07), et 17 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (18/08 et 25/08), de façon concomitante avec une dominance de *Microcystis* à ces deux dates (entre 85 % et 57 % du phytoplancton) (Figure 3.18A).

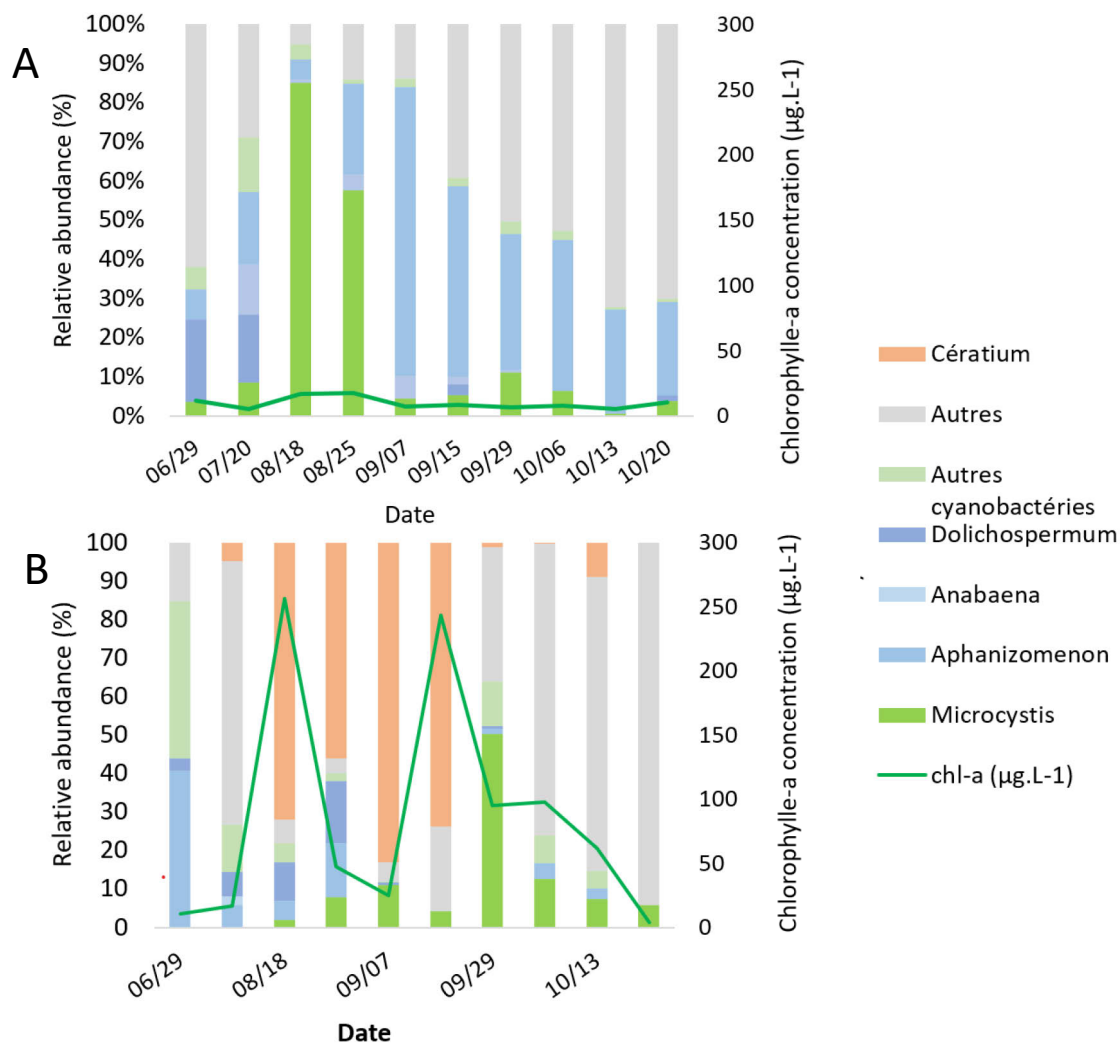


Figure 3.18 Proportion relatives des principales cyanobactéries et microalgues au et variation de la chlorophylle-a (vert) en fonction du temps pour (A) l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil) et (B) l'étang des Galets (Cergy).

En parallèle, nous avons quantifié les abondances de bactéries totales, de cyanobactéries et de *Microcystis* (en ciblant différentes régions de l'ADNr16S), par PCR quantitative. Pour déterminer la proportion de cellules capables de former des iACC au sein de la population de *Microcystis*, l'abondance du gène *ccyA* a été mesurée (figure 3.19A) et détectée tout au long de l'étude, indiquant donc la présence de cellules formant potentiellement des iACC. Nous observons une abondance moyenne de 10^4 copies.mL $^{-1}$ avec deux pics à 10^5 copies.mL $^{-1}$ aux dates du 08/10 et 25/10 août (figure 3.19A, Tableau SIII.IV).

C'est à ces deux dates que la proportion de *Microcystis ccyA+* au sein de la population est la plus faible (12 %, figure 3.19A, Tableau III.V). On observe que la proportion de *Microcystis ccyA+* atteint 72 % (± 23) fin Octobre, mais avec une abondance totale faible (Figure 3.19A, Tableau SIII.IV).

Si la présence du gène *ccyA* a bien été détectée, aucun transcrit *ccyA* n'a pu être détecté par RT-qPCR, alors que les transcrits ARNr16S spécifiques de *Microcystis* étaient détectés (Tableau SIII.IV), ainsi qu'une concordance entre les abondances de *Microcystis* détectées par ADN et ARN (Figure S3.3).

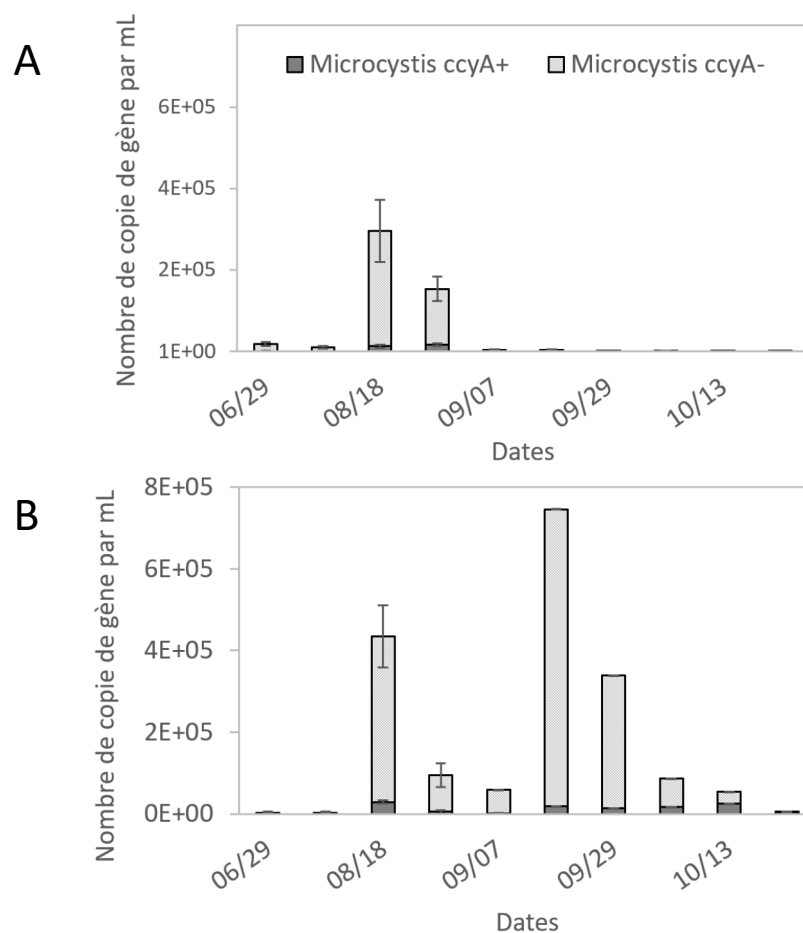


Figure 3.19 Evolution de l'effectif des populations de *Microcystis* au cours du temps. (A) et (B) Population *ccyA+* en gris plein et *ccyA-* en grisé pour (A) l'étang des Galets (Cergy) et (B) l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil). Les barres d'erreur proviennent de mesures sur trois répliques techniques.

Tableau III.IX Proportions de *Microcystis ccyA+* dans l'ensemble de la population de *Microcystis* (gène ARNr 16S) pour les deux sites étudiés.

Date	Site de Cergy	Site de Verneuil
29/06/2021	6 ± 7	32 ± 30
20/07/2021	8 ± 5	23 ± 15
18/08/2021	5 ± 2	7 ± 2
25/08/2021	12 ± 3	6 ± 1
07/09/2021	62 ± 30	3 ± 3
15/09/2021	18 ± 7	3 ± 1
29/09/2021	65 ± 22	4 ± 1
06/10/2021	24 ± 12	20 ± 6
13/10/2021	37 ± 15	48 ± 12
20/10/2021	72 ± 23	53 ± 17

3.2 Site de l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil)

3.2.1 Composition chimique et état de saturation des solutions

Le Tableau III.III présente les données géochimiques du compartiment dissous pour le site de Verneuil. L'ensemble des échantillons ont une balance des charges comprise entre -5 et -0,7 %. L'évolution temporelle de la température et du pH se découpe de nouveau en deux périodes : (i) une période chaude avec des températures entre 21,7 et 26,1 °C et des pH élevés entre 8,6 et 10,1, et (ii) une période froide avec des températures entre 16 et 19,2 °C et des pH plus faibles entre 7,6 et 8,2 (Figure 3.4B).

La concentration en P total varie entre 50 et 315 µg/L, avec des pics de chl-a pouvant atteindre 250 µg.L⁻¹, positionnant le site comme eutrophe à hypereutrophe (figure 3.5B). Au sein du P total, la majorité était présente sous forme dissoute de 40 et 310 µg.L⁻¹, et peu dans la fraction particulaire de 17 et 89 µg.L⁻¹. Comme pour le site de Verneuil, les concentrations en ions nitrites (NO₂⁻) et nitrates (NO₃²⁻) étaient en deçà des limites de détections pour toute la période. La concentration en ions ammonium (NH₄⁺), variait entre 0,7 et 99 µM (soit 10 et 1800 µg.L⁻¹) (Figure 3.7C).

La teneur en calcium dissous (Figure 3.7) variait entre 930 µM (19 juin) et 1100 µM (20/10). On observe une augmentation légère mais constante entre le début et la fin de la saison, mis à part pour une date (20/07). La projection de la composition ionique des eaux dans les systèmes ternaires et quaternaires décrit de nouveau une eau alcalino-terreuse avec une proportion importante de Ca²⁺ et le bicarbonate comme ions dominants (46) (Figure 3.8). La variation relative temporelle de la concentration en calcium est peu marquée, mais on voit une nette variation dans la teneur en anions (Figure 3.9B). On observe un appauvrissement relatif en HCO₃⁻+CO₃²⁻ entre le 29/06 (environ 75 % d'HCO₃⁻+CO₃²⁻) et le 07/09 (environ 60 % d'HCO₃⁻+CO₃²⁻). A partir du 15/09 (période froide) la teneur en HCO₃⁻

+CO₃²⁻ reste fixe et l'eau est très enrichie en CO₃⁻+HCO₃²⁻ (80 %) en comparaison avec les dates antérieures (période chaude).

L'évolution de la saturation des eaux par rapport à différentes phases carbonatées (Figure 3.10B) indique un état sursaturé par rapport à l'aragonite et la calcite pour toutes les dates sauf une (20/10). Pour cette date, l'eau était sous-saturée par rapport à toutes les phases carbonatées. Le 29 juin, le site de Verneuil est dans un état saturé par rapport à l'ACC1 et à la monohydrocalcite. On observe pendant la période chaude une augmentation de l'état de saturation jusqu'au 07/09. Puis, une diminution forte à partir de la période froide (15/09) où l'eau est de nouveau située sur la ligne de saturation de l'ACC1 et de la monohydrocalcite.

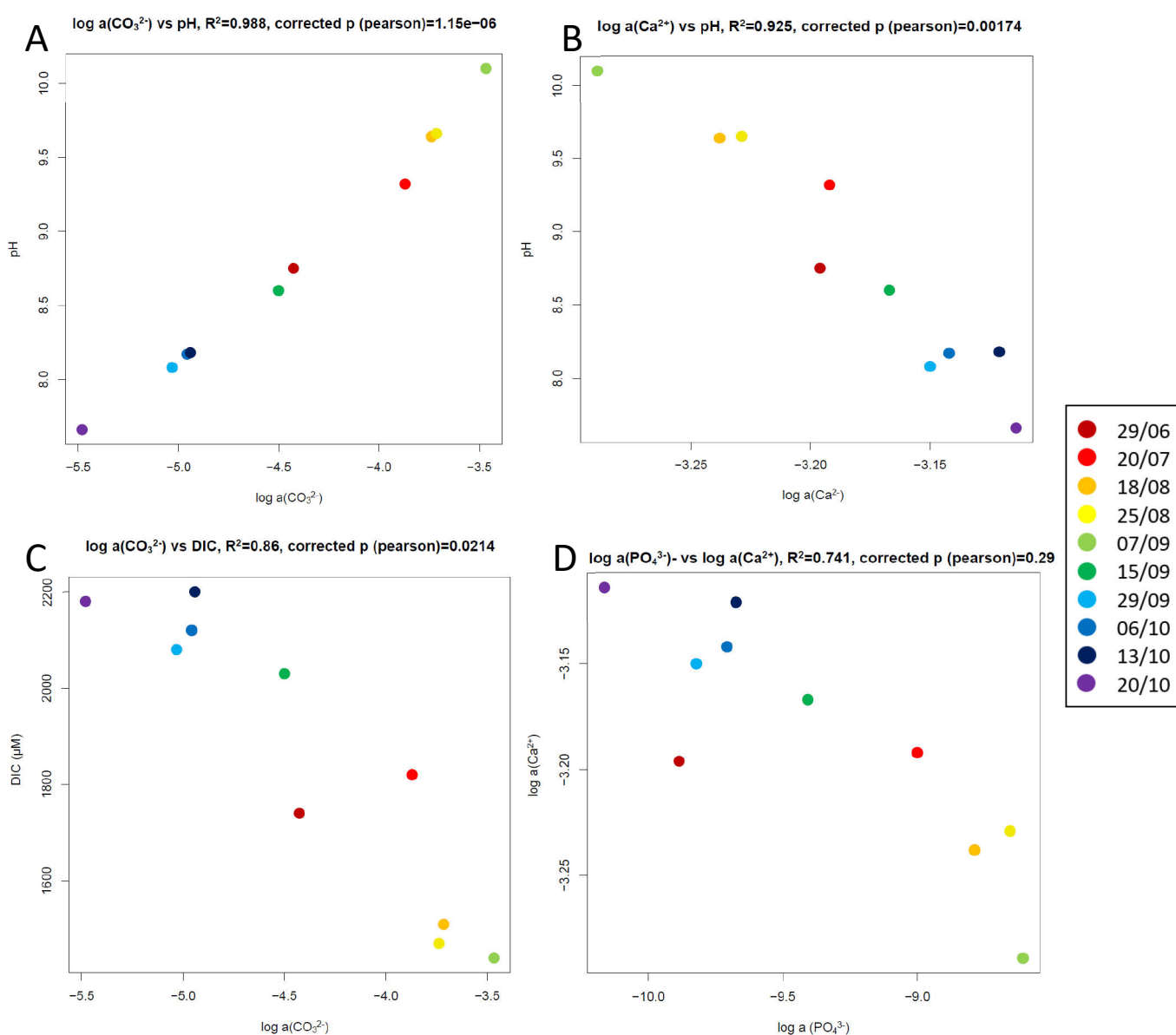


Figure 3.20 Evolution du pH en fonction de (A) log a(CO₃²⁻) et (B) l'log a(Ca²⁺) pour le site de Verneuil. (C) Evolution du DIC en fonction de l'a(CO₃²⁻) et (C) Diagramme de solubilité dans l'espace log a(PO₄³⁻) en fonction du log a(Ca²⁺) pour le site Verneuil

Comme pour le site de Cergy, on observe une corrélation significative entre la diminution de l'activité des ions CO_3^{2-} et la diminution du pH ($R^2 = 0,988$, $p\text{-value} = 1,15 \times 10^{-6}$, Figure 3.20A, Figure S3.4), et entre la diminution du pH et l'augmentation de l' $a(\text{Ca}^{2+})$ ($R^2 = 0,925$, $p\text{-value} = 0,00174$ Figure 3.20B, Figure S3.4). De plus, on observe ici une anticorrélation significative entre l'augmentation du DIC et la diminution de l' $a(\text{CO}_3^{2-})$ ($R^2 = 0,86$, $p\text{-value} = 0,0214$, Figure 3.20C, Figure S3.4). Enfin, l'activité de l'ion Ca^{2+} est anticorrélée ($R^2 = 0,7407$, $p\text{-value} = 0,00174$ à celle de l'ion PO_4^{3-} (Figure 3.20D), suggérant la présence d'une phase de phosphate de calcium.

3.2.2 Composition chimique de la matière particulaire (ATR-FTIR et ICP-AES)

La figure 3.21 montre les spectres en ATR-FTIR dans l'infrarouge (IR) moyen pour la matière en suspension du site de Verneuil. L'annotation des pics a été faite de façon similaire à l'analyse faite sur la matière en suspension du site de Cergy (voir tableau III.V). Comme pour le site de Cergy, de nombreux pics sont associés aux fonctions chimiques de la matière organique, ainsi qu'à la présence de polyphosphates et/ou de silice amorphe (bandes 16 à 18, $1077\text{--}1035\text{ cm}^{-1}$). La présence de diatomées dans la plupart des échantillons, ainsi que l'observation de polyphosphates par MEB dans plusieurs microorganismes (Figure 3.22E,F et H, Figure 3.23, S3.7), soutiennent cette interprétation. On observe les deux pics signatures de la calcite sur certains des échantillons de Verneuil, même s'ils restent toujours d'intensité relativement faible : les échantillons du 29/06, 29/15, et du 6/10 et 13/10 montrent une contribution de la calcite. Pour l'échantillon du 13/10, la contribution d'un pic à 860 cm^{-1} pourrait expliquer la forme large du pic à 872 cm^{-1} . Comme vu précédemment, la présence d'un pic à 860 cm^{-1} est un diagnostic de la présence d'iACC dans un échantillon (32).

Comme pour Cergy, la teneur en aluminium est relativement négligeable devant le calcium et le phosphore, nous conduisant à négliger la contribution de phases alumineuses dans le portage du Ca. Dans le ternaire Ca-P-Si (Figure 3.22A), nous voyons certains points regroupés autour d'une composition Ca :P :Si d'environ 65 : 20 : 15. Un groupe de points tend vers un pôle Ca : P de 1 : 1, suggérant la présence d'une phase de phosphate de calcium. Dans le ternaire Ca-P-S (Figure 3.22B), nous observons comme pour Cergy que les points s'étalent principalement entre le pôle Ca et le joint P-S, suggérant des proportions variables dans un mélange entre la matière organique (joint P-S) et une ou plusieurs phases de carbonates de calcium (calcite, ACC et/ou calcite magnésienne ; pôle Ca) avec un maximum de carbonates de calcium le 29/06. Cependant on observe aussi quelques points le 09/07 et le 29/07 qui semblent sortir de cette tendance à deux pôles et s'enrichir en un pôle contenant plus de Ca et de P avec un rapport molaire Ca :P d'environ 1 :1. Ceci serait de nouveau compatible avec la signature de la présence d'une phase de phosphate de calcium. Dans le ternaire K-P-S (Figure 3.22C), on retrouve comme à Cergy un regroupement de la plupart des points avec quelques points (29/09) qui montrent un enrichissement relatif en P, soutenant la tendance observée dans le ternaire Ca-P-S (Figure 3.22B). D'après cette ligne de mélange, l'on peut en déduire un rapport molaire P/S d'environ 1,5 dans la matière

organique. Dans le ternaire K-P-S (Figure 3.22C), on observe que tous les points se regroupent au même endroit et nous interprétons cela comme le fait que ces 3 éléments sont principalement portés par la biomasse dans ce système. Là encore nous pouvons déduire la stœchiométrie suivante P:S :K comme 46 % :34 % :20 %.

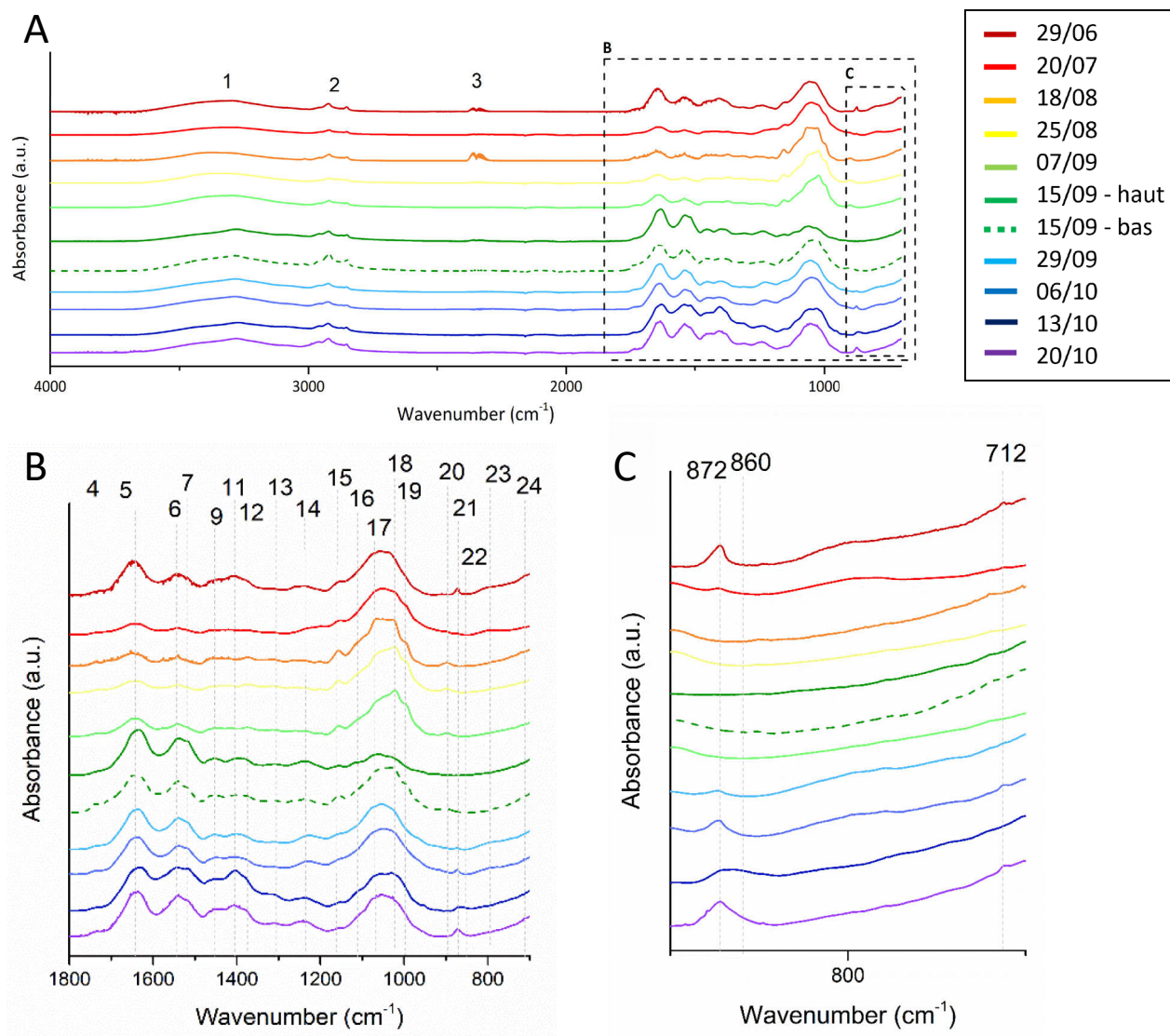


Figure 3.21 Spectres d'absorption ATR-FTIR des échantillons de l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil) dans l'IR moyen. L'insert 1 montre un zoom de la région entre 1800 et 900 cm⁻¹. Les numéros sur les spectres correspondent aux numéros de bande et leur attribution est fournie dans le tableau III.V. Les lignes grises en tirets sont des lignes directrices pour faciliter l'identification de la position des bandes. L'insert 2 montre un zoom de la région entre 900 et 700 cm⁻¹ où l'on trouve les caractéristiques spectrales discriminantes des carbonates de calcium.

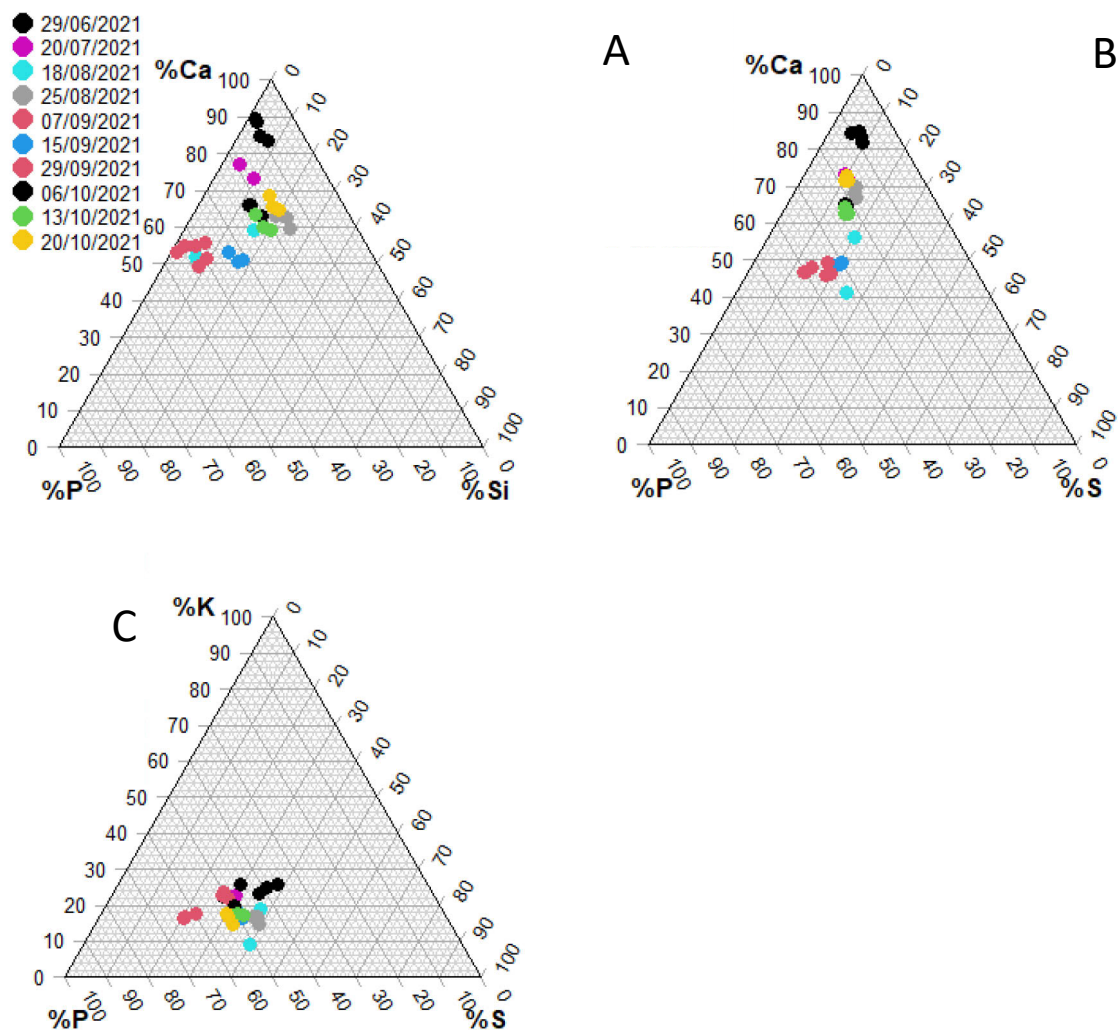


Figure 3.22 Analyse de la composition chimique élémentaire du particulaire de la Grosse Pierre (Verneuil). (A) Représentation dans les systèmes ternaires (A) Ca-P-Si, (B) Ca-P-S et (C) K-P-S. Les points correspondent aux trois triplicats biologiques.

3.2.3 3.2.3. Spéciation du Ca particulaire (XANES)

La figure 3.23 montre les spectres XANES normalisés au seuil du Ca (A) ainsi que les dérivées de ces spectres d'absorption (B) pour les dates du 29 juin, 18 août, 25 août et 15 septembre, ainsi que pour la calcite de référence. Un ajustement des spectres par combinaison linéaire (LCF) a été réalisé de façon similaire à celui utilisé pour le site de Cergy. Plusieurs composants (spectres de références) ont été utilisés : des phases minérales de référence comme (1) la calcite, (2) la calcite magnésienne (Mg-calcite), (3) le Ca-pyrophosphate, (4) le Ca-acétate, et (5) l'hydroxyapatite ; pour modéliser la part du Ca compris dans la biomasse, (6) une souche de *Microcystis* formatrice d'iACC (PMC 827), et (7) une souche de *Microcystis* ne formant d'iACC (PMC 568). Les résultats de l'ajustement sont présentés dans le Tableau III.X. Les résultats d'ajustement représentés sur la Figure 3.25B sont ceux présentant les R-factors les plus bas (en grisé dans le tableau III.X). De nouveau,

les pourcentages d'affiliation ont une erreur de $\pm 10\%$. Seule la date du 06 juin montrait une part du Ca total affilié à de la calcite ($\approx 60\%$), les $\approx 40\%$ restant étant affiliés à de la biomasse. L'utilisation d'une souche iACC- au lieu d'une souche iACC+ pour modéliser la biomasse améliorerait le R-factor de 50 %, on peut donc raisonnablement exclure la présence de souches formatrices d'iACC en quantité suffisante pour être détecté par cette technique dans cet échantillon. Pour les dates du 18 et 25 août, le meilleur résultat de LCF montrait une contribution de 78 % et 60 % de la biomasse, et 22 % et 17 % du Ca-acetate. Pour le 25 août, la calcite magnésienne contribuait également à 21 % du réservoir de Ca total. Dans les deux cas, l'utilisation du spectre de PMC 568 (iACC-) améliorait le R-factor, mais la forme du spectre issu de l'ajustement décrit mal celle du spectre initial (Figure 3.23B). Le fait que le Ca-acétate pour modéliser la biomasse améliorait l'ajustement suggère que l'utilisation de biomasses cyanobactériennes n'est pas entièrement adaptée pour ces échantillons. Enfin, pour le 15 septembre, l'ajustement décrit très bien le spectre initial, avec 70 % du Ca associé à la biomasse (PMC 568, iACC-) et 30 % avec du Ca-pyrophosphate. De nouveau, l'amélioration du R-factor par l'utilisation d'une souche iACC- pour modéliser la biomasse suggère l'absence de cellule formatrice d'iACC en quantité suffisante pour contribuer de façon significative au Ca total.

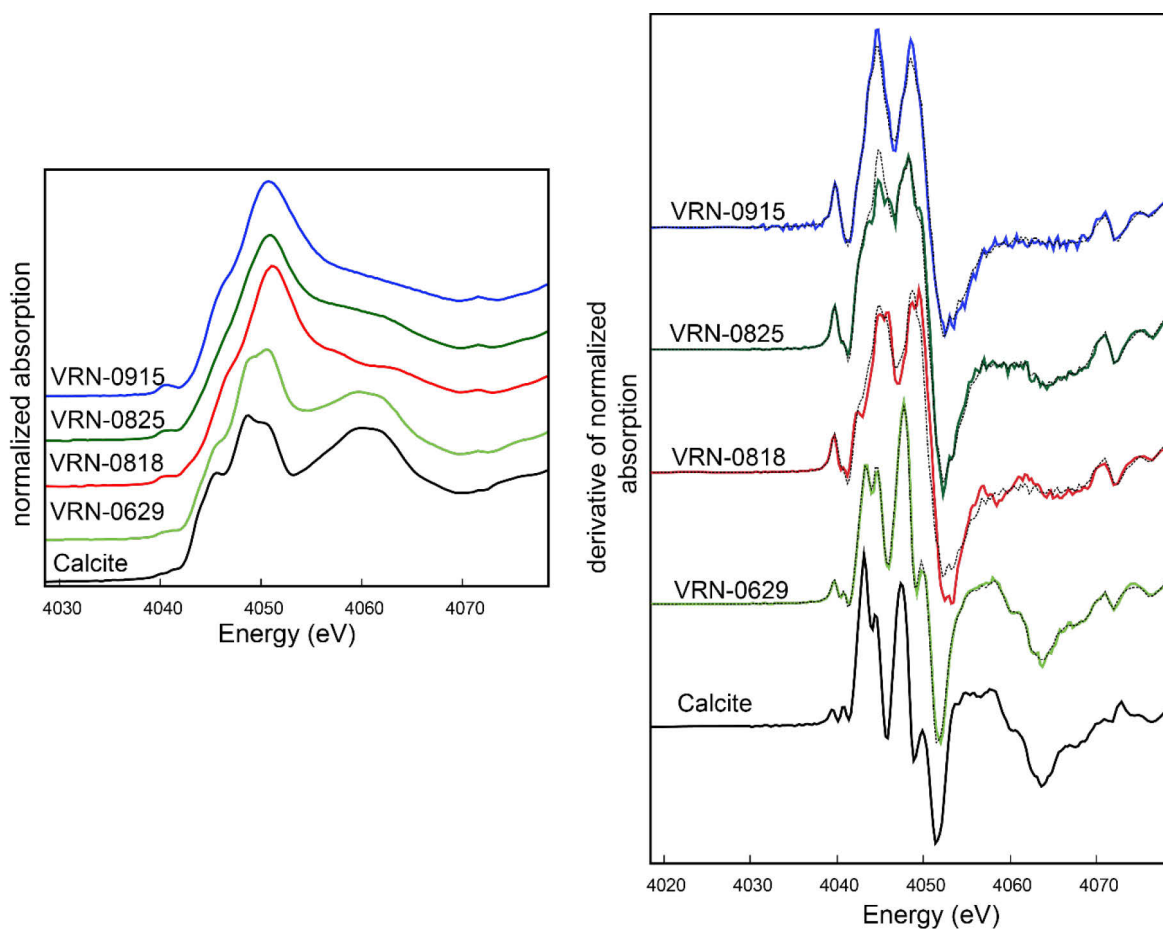


Figure 3.23 Analyses XANES de la matière en suspension de l'étang de la Grosse Pierre (A) Spectres XANES normalisés de la matière en suspension et de calcite. (B) Spectres XANES dérivés de la matière en suspension et de calcite. Les lignes pleines représentent les données expérimentales et les lignes pointillées les résultats de la méthode LCF

Tableau III.X Valeurs de la contribution des différentes phases de référence dans l’ajustement des spectres par combinaison linéaires pour le site de Verneuil. Pour chaque date, l’ajustement représenté sur la figure 3.23B est surligné en gris.

	PMC827 (iACC+)	PMC 568 (iACC-)	Ca- pyrophosphate	Mg- calcite	Ca- acetate	Hydroxyapatite	Calcite	R-factor
29/06		38					61	0.0048779
	38						62	0.009677
18/08		78			22			0.041814
	53				47			0.082586
25/08		60		21	19			0.0109208
	17	63		20				0.0145924
	53			22	25			0.0248822
15/09		70	30					0.0082324
	57		43					0.020154

3.2.4 Analyses MEB et MET de la matière particulaire

Des phases riches en Ca uniquement, associées à des phases riches en Si et Al ont pu être observées dans la matière en suspension du site de Verneuil (Figure 3.24). Au contraire de phases observées à Cergy, leur morphologie ne permet pas de déterminer s’il s’agit de débris de tests de *Phacotus* sp. ou d’une phase vraisemblablement abiotique. Des tests entiers ou partiels de *Phacotus* sp. ont bien été observés dans 7 échantillons sur 10, mais non dénombrés (tableau III.VII, Figure S3.4), et aucune cartographie EDXS n’a été réalisée sur ces tests.

Comme pour Cergy, la présence d’iACC dans des cellules de *Microcystis* a été détectée par des analyses en MEB-EDXS et/ou STEM-EDXS pour 7 dates sur 10 pour chacun des sites (Figure 3.24A-D, Tableau III.VIII). Des *Microcystis* formant uniquement des polyP (Figure 3.24E-H) ont également été détectées à toutes les dates.

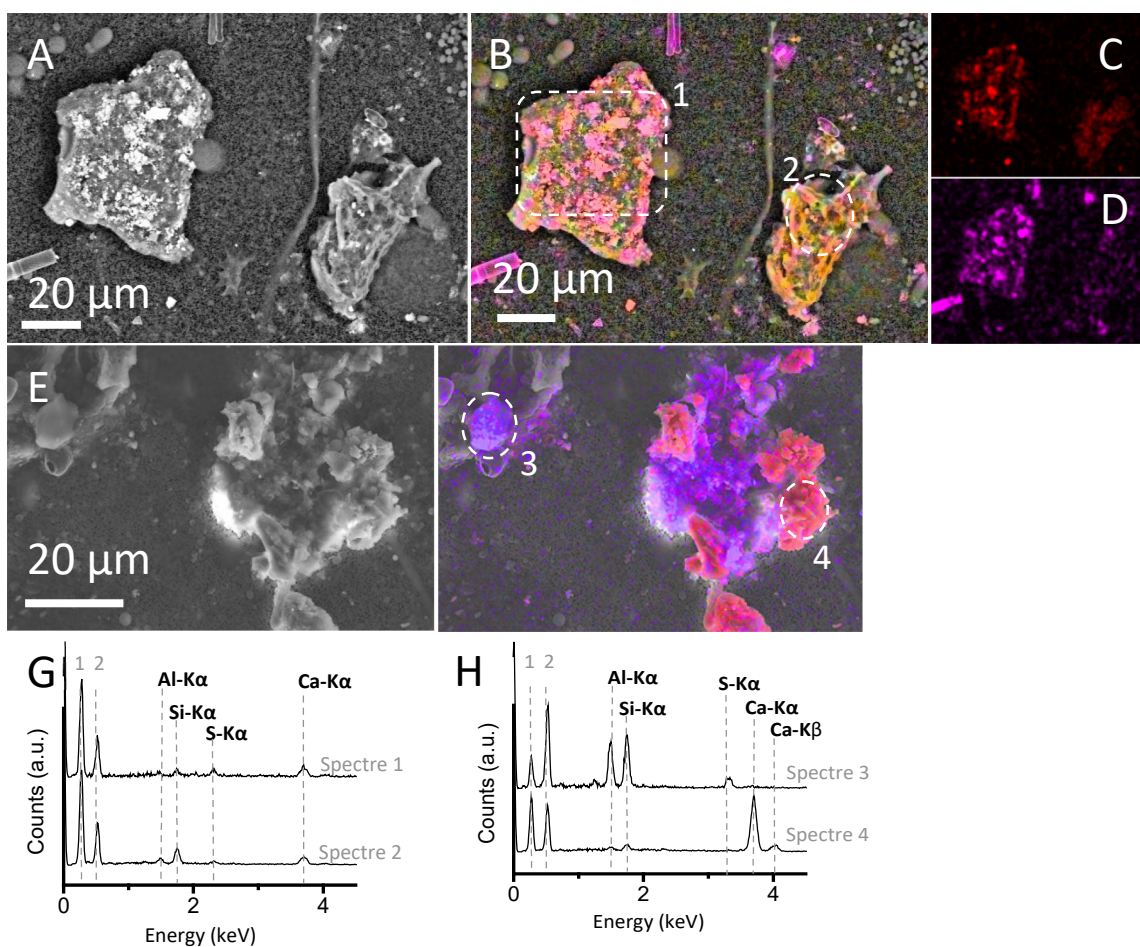


Figure 3.24 Analyses MEB représentatives de la diversité des phases riches en Ca l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil). (A) Image MEB en mode de détection AsB (B) Superposition correspondante de l'image AsB et des cartes MEB-EDX du Ca (rouge), Si (rose) et Al (orange). (C et D) cartographies MEB-EDXS du Ca et Si uniquement. (G) Spectres de rayons X à dispersion d'énergie (EDXS) correspondants aux encarts 1 et 2 dans l'image B. (E,F et H) Données du même type pour une autre phase riche en Ca. Les étiquettes des lignes d'émission dans les spectres EDXS sont : (1) : C Kα et (2) O Kα.

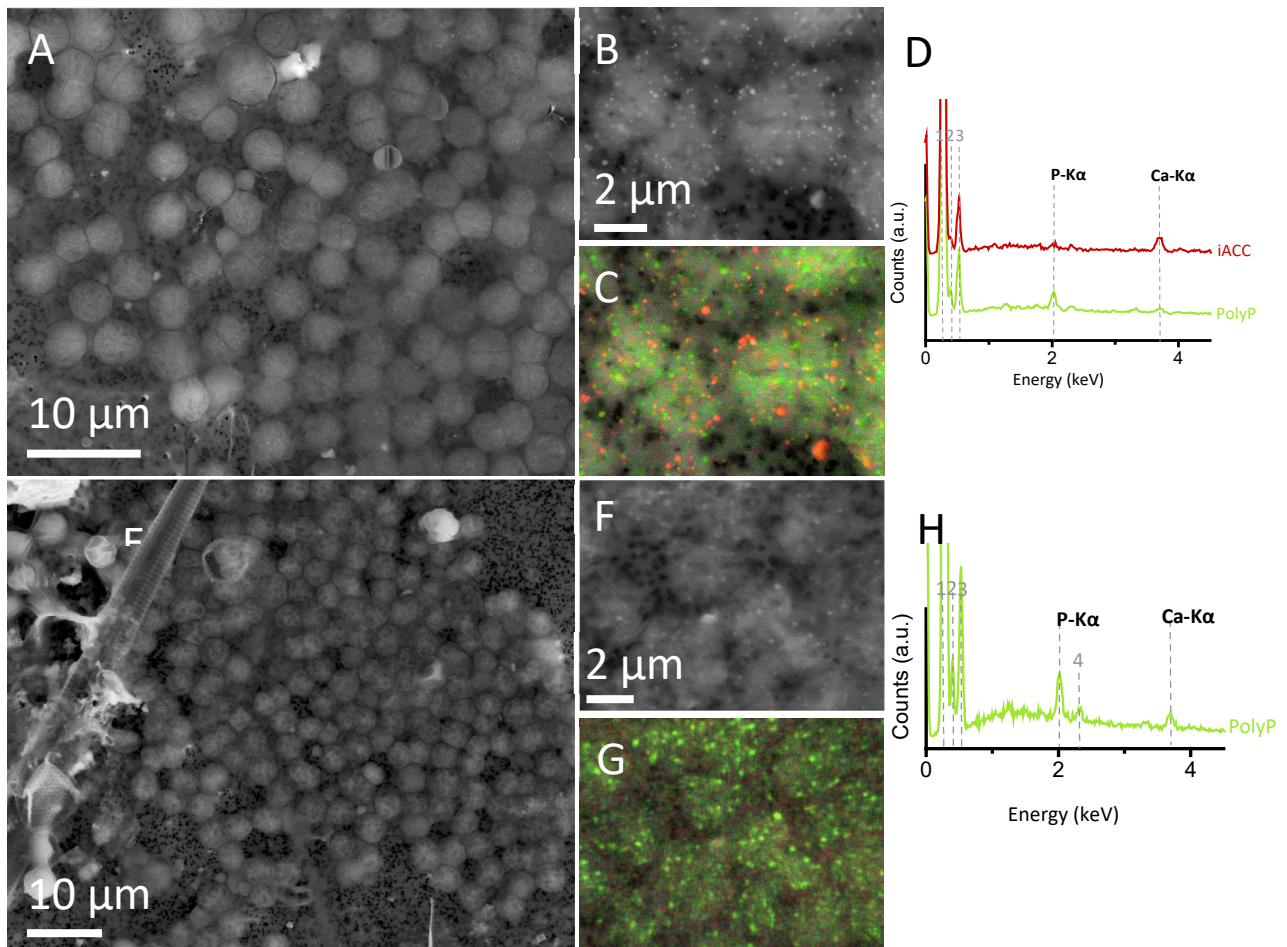


Figure 3.25 Analyses MEB de *Microcystis* formant des granules iACC et PolyP dans l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil) (A) Image MEB en mode de détection MEB de cellules de *Microcystis* formant des iACC et des PolyP. (B) Images MEB en mode de détection AsB d'une vue rapprochée des cellules de *Microcystis*. (C) Superposition correspondante de l'image AsB et des cartes SEM-EDX de Ca (rouge) et P (vert). Les iACC apparaissent en rouge et les granules de PolyP en vert. (D) Spectre EDXS des granules de iACC (points rouges) et des granules de polyP (points verts). (E-H) : données du même pour des cellules formant uniquement des polyP. Les étiquettes des lignes d'émission dans les spectres EDXS sont : (1) : C K α ; (2) N K α ; (3) O K α ; (4) Mg K α

3.2.5 Dynamique des populations de *Microcystis*

Le site de Verneuil présente un taux de chlorophylle bien plus élevé que celui de Cergy (Figure 3.18), avec des maxima de 256 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (18/08) et 243 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (15/09), correspondant à un bloom de dinoflagellés du genre *Ceratium* (environ 70 % de la communauté phytoplanctonique) (Figure 3.18B). *Microcystis* est détectée dès le 18/08, mais en faible proportion (2 à 4 % du phytoplancton). A partir du 29/09, *Microcystis* représente 50 % du phytoplancton, alors que la teneur en chl-a atteint 95 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

La présence du gène *ccyA* a été détectée pour toutes les dates. En début de période chaude (29/06 et 07/07), les abondances de *Microcystis* sont faibles (2.10³ et 3.10³ copies.mL⁻¹), mais la proportion de *ccyA*+ dans la population atteint 32 \pm 30 et 23 \pm 15 %, respectivement (Figure 3.19B, Tableau SIII.IV). Deux pics d'abondance de *Microcystis* sont

déTECTÉS avec des maxima à $5,6 \pm 0,56 \times 10^5$ (08/08) et $9,7 \pm 0,71 \times 10^5$ copies.mL⁻¹ (09/09). Pour ces dates, la proportion de *Microcystis ccyA+* par rapport à la population entière ne dépasse jamais 10 %. On observe un changement de dynamique entre le 06/10 et le 13/10 : si l'abondance de *Microcystis* diminue (de $1,1 \pm 0,16 \times 10^5$ à $7 \pm 0,62 \times 10^4$ copies.mL⁻¹), la population *ccyA+* augmente d'un facteur 2, faisant passer le ratio *ccyA+*/population totale de 20 ± 6 à 48 ± 12 %.

4 Discussion

4.1 Site de Cergy

4.1.1 Origine du contrôle de la concentration en Ca²⁺ et du DIC en solution

Pour le site de Cergy, la teneur en ions carbonates (CO₃²⁻) tend à diminuer au cours du temps. Cette variation pourrait être liée à une diminution du carbone inorganique totale (DIC), mais celui-ci augmente au cours du temps. En parallèle, le pH de l'eau lui diminue au cours de la saison (Figure 3.4A), et sa diminution est fortement corrélée positivement à la diminution en CO₃²⁻ (Figure 3.11A). La baisse du pH déplace l'équilibre des ions carbonates vers l'ion bicarbonate, diminuant de fait la teneur en ions carbonates. Ce n'est donc pas une diminution du pool total de carbone inorganique qui explique la baisse de la teneur en ions carbonates, mais bien l'effet pH. Comment expliquer cette baisse du pH et cette augmentation du DIC vers la fin de la saison et/ou à l'inverse l'augmentation de pH et la diminution du DIC lors de la saison chaude ?

Un des métabolismes microbiens qui consomme du carbone inorganique, tout en libérant des ions OH⁻ et donc augmentant le pH, est la photosynthèse (47). En « période chaude », principalement sur les dates du 18 et 25 août, la teneur en chl-a, est plus élevée (Figure 3.5A). Cependant, il n'y a pas de corrélation significative entre la dynamique de la teneur en chl-a et le DIC ou le pH (Figure S3.1A) au cours du temps, ce qui suggère que la photosynthèse ne serait pas le seul facteur direct ou indirect. En effet, le lien entre la concentration en chl-a et la productivité primaire n'est cependant pas une simple fonction linéaire (48,49), et la température pourrait jouer un rôle. On peut également noter que les mesures ont été effectuées à une heure précise de la journée et que le pH varie vraisemblablement au cours de la journée. Après le 15/09, la température diminue fortement (Figure 3.4A). La solubilité du CO₂ augmente avec la baisse de la température de l'eau, ce qui fait augmenter le carbone inorganique total et diminuer le pH (50), ce qui va dans le sens de nos observations.

En se concentrant sur l'activité de l'ion Ca²⁺ en fonction de celle de l'ion CO₃²⁻, nous observons deux groupes de points selon les deux périodes de température. Pour la période chaude (du 29/06 au 15/09), les points sont regroupés sur la ligne de saturation de l'ACC de Kellermeier *et al.* 2014 (51) et de la monohydrocalcite (Figure 3.10A). Premièrement, cela montre qu'à cette période la précipitation extracellulaire de CaCO₃ peut se faire

spontanément, au-delà des contraintes cinétiques (52,53). De plus, cela suggère que pour cette période, la précipitation de l'une de ces phases minérales (carbonate de calcium amorphe ou monohydrocalcite) pourrait contrôler le couple (concentration en calcium-carbonate) dans la colonne d'eau. Pour la période froide (du 29/09 au 20/10) les points sont plus dispersés, et l'état de saturation diminue de presque 1 unité en moyenne. A cet instant, la précipitation spontanée extracellulaire est alors moins favorable cinétiquement, même si elle reste possible thermodynamiquement. Pour les carbonates d'origine biologique et intracellulaires en revanche, on ne sait pas à ce jour si et comment la saturation de la solution extracellulaire influe sur leur formation. De façon intéressante, une étude par Gruenert et Raeder (2014) (54) a suggéré que l'augmentation de la saturation par rapport à la calcite pouvait induire la croissance des populations de *Phacotus*, ce qui serait cohérent avec nos observations. Cette augmentation conduirait à une plus importante précipitation de calcite, modifiant la concentration en calcium dissous dans le milieu (Figure 3.7).

4.1.2 Spéciation du calcium dans la fraction particulaire

La composition de la matière particulaire a été analysée en combinant plusieurs outils (ICP-AES, MEB-EDXS, STEM-HAADF-EDXS, l'ATR-FTIR et le XANES), permettant de détecter les carbonates de calcium formés par certaines *Microcystis* et d'estimer l'abondance relative par rapport aux autres phases riches en Ca. Ainsi, différentes phases contenant du Ca ont été identifiées dont des phases cristallines de CaCO_3 , probablement de la calcite, parfois magnésiennes, qui seraient prépondérantes en tant que porteuses de Ca. Lorsqu'on considère l'évolution temporelle de la taille des pics à 872 cm^{-1} et 712 cm^{-1} sur les spectres FTIR, il apparaît que la quantité relative de calcite dans l'échantillon diminue entre le 29/06 et le 25/08 (Figure 3.12C). Ensuite, les dates du 07/09 et du 06/10 présentent un pic à 872 cm^{-1} très faible, et aucun pic à 712 cm^{-1} , donc une quantité de calcite probablement très faible dans l'échantillon, malgré le fait qu'à cette date, la saturation de la solution par rapport à la calcite soit maximale comparée aux autres dates. Ainsi, il est difficile de relier les niveaux de saturation des solutions et la présence ou l'intensité des pics d'absorption. Une solution sursaturée par rapport à une phase cristalline peut indiquer des conditions favorables à la précipitation de cette phase. Cependant, cette précipitation peut avoir une cinétique variable, et la phase précipitée un devenir divers : on peut par exemple observer une sédimentation rapide des phases formées.

Les abondances relatives de calcite et de calcite magnésienne comme porteuses de Ca dans la matière particulaire sont confirmées par spectroscopie XANES (> 80 % pour trois dates sur quatre) (Tableau III.VI). On observe en effet que la calcite représentait entre 21 et 60 % du Ca total, et de la calcite-magnésienne entre 0 et 48 % du Ca total, ce qui est concordant à la fois avec la spectroscopie FTIR et avec l'observation de particules de calcite et de calcite magnésienne au MEB (Figure 3.15). Ici aussi, des observations ponctuelles de particules de calcite magnésienne ont été faites en MEB (Figure 3.15A-C). De façon surprenante, 8 % du Ca total pour l'échantillon du 15 septembre étaient attribués à de

l'hydroxyapatite. Pourtant, aucune phase contenant du Ca et du P n'a été observée en microscopie électronique. A noter que l'ordre de grandeur de l'erreur dans l'ajustement par combinaison linéaire est de 10 %. Notre approche consiste en du « fingerprinting » c'est-à-dire que nous utilisons pour les ajustements par combinaison linéaire (LCF) les spectres dont nous disposons et qui ressemblent le plus aux spectres observés, en prenant en compte le reste des analyses pour choisir nos composants. Une ressemblance des spectres n'implique cependant pas une identité et il reste donc à identifier ce composant portant le calcium et ayant un spectre XANES similaire à celui de l'hydroxyapatite.

La présence d'iACC a été confirmée par microscopie électronique (MEB et STEM-HAADF couplé à de l'EDXS) pour 7 dates sur 10. Comme mentionné précédemment, la présence d'un pic à 860 cm^{-1} sur un spectre d'absorption IR est une caractéristique spectrale qui permet de diagnostiquer la présence d'iACC d'origine cyanobactérienne dans un échantillon. Ici, aucun pic ne peut être observé à ce nombre d'onde, suggérant que le MEB est donc plus sensible pour la détection d'iACC au moins avec ce type de matrice. De façon similaire, pour toutes les dates, la modélisation de la biomasse par une souche iACC+ dans nos spectres XANES n'améliore pas nos scores d'ajustement, ce qui suggère que s'il y a des souches formatrices d'iACC, elles ne contribuent pas au Ca total compte tenu du seuil de détection de cette approche. La présence d'iACC a été confirmée par microscopie électronique (MEB et STEM-HAADF couplés à de l'EDXS) pour les deux dernières dates (Tableau III.VIII).

Comme discuté précédemment, *Phacotus* est une algue capable de former des cristaux de calcite de façon intracellulaire avant de les exporter à sa surface et présente dans de nombreux écosystèmes lacustres (55). Sa présence quasi-continue sur le site de Cergy (Tableau III.VII) suggère qu'une partie de la calcite serait d'origine biotique. Bien qu'il ne soit pas possible de déterminer la part de calcite originaire des cellules de *Phacotus*, entre 21 et 60 % du Ca total étaient sous forme de calcite pour le site de Cergy. Ainsi la calcite de *Phacotus* contribuerait potentiellement de façon plus importante au réservoir du Ca particulaire total que les iACC de *Microcystis*.

4.1.3 Dynamique de *Microcystis* vis-à-vis de la biominéralisation d'iACC

Au cours de ces travaux, nous avons donc identifié des iACC par microscopie MEB dans des cellules de *Microcystis* sur la quasi-totalité des dates confirmés par la microscopie électronique. Les observations MEB sont ponctuelles, notamment pour l'EDXS et ne permettent pas de quantifier de façon les iACC au sein des échantillons. De plus, la combinaison des autres outils quantitatifs, de spectroscopies XANES, et ATR-FTIR n'ont pas permis de mettre en évidence la formation d'ACC, suggérant que celle-ci soit trop faible pour être quantifiable et détectable par ces outils avec nos échantillons naturels. En parallèle, par biologie moléculaire, nous avons détecté et quantifié le gène *ccyA* (proxy des *Microcystis* iACC+), mais les transcrits *ccyA* restaient faibles à toutes les dates. Ces résultats sont donc cohérents avec la faible détection d'iACC par microscopie électronique.

Pour trois dates, aucun iACC n'a été détecté en microscopie électronique malgré la détection du gène *ccyA*, bien que la population *ccyA+* montrait des abondances similaires aux autres dates pour lesquelles des iACC ont été observés (e.g. 18/08) (Figure 3.19, Tableau III.VIII). Aucun transcrit (ARN) du gène *ccyA* n'a été détecté sur toute la saison (Tableau SIII.IV). Un nombre trop restreint de cellules de *Microcystis* analysées en microscopie est un facteur limitant pour la détection des iACC. De plus, le gène *ccyA* n'est pas le seul susceptible d'être impliqué dans la formation des iACC : il existe en effet deux souches de la collection PCC qui possèdent le gène mais ne forment pas d'iACC (8). Ainsi, il est possible qu'il manque un ou des gènes nécessaires à la biominéralisation. Enfin, une autre possibilité, qui fera l'objet du chapitre 3, est que l'expression des gènes (notamment le gène *ccyA*) est possiblement différente chez ces souches *ccyA+*. Même si présent, le gène *ccyA* n'a peut-être pas un niveau d'expression suffisant pour permettre la formation des iACC en grande quantité par exemple.

4.2 Site de Verneuil

4.2.1 Dynamique géochimique du compartiment dissous

Une dynamique similaire est observée entre la diminution du pH et celle de l'activité des ions CO_3^{2-} , ainsi que la distinction en deux périodes chaude et froide : le pH diminue et la concentration en DIC augmente à partir du 15/09 (période froide), par rapport au début de la saison (période chaude) (Figure 3.4B, 3.20). Aucun lien direct n'est détecté entre l'évolution de la teneur en chl-a et le DIC ou le pH (Figure S3.1B). Après la date du 15/09, la température diminue (Figure 3.4B). Ainsi, la baisse de $a(\text{CO}_3^{2-})$ est interprétée comme la résultante de l'augmentation de la solubilité du CO_2 avec la baisse de la température de l'eau, ce qui fait augmenter le carbone inorganique total et diminuer le pH (50).

L'évolution temporelle de calcium dissous varie peu : on observe que les points ne sont pas regroupés sur une ligne de saturation dans le diagramme de solubilité de l'activité de l'ion Ca^{2+} en fonction de celle de l'ion CO_3^{2-} , comme pour le site de Cergy. Deux points sont tout de même situés sur la ligne de saturation de l'ACC de Kellermeier *et al.* (51) et de la monohydrocalcite (29/06 et 15/09). A ces dates, la précipitation extracellulaire de CaCO_3 peut peut-être se faire spontanément, au-delà des contraintes cinétiques (52,53). De plus, la précipitation de l'une de ces phases minérales (carbonate de calcium amorphe ou monohydrocalcite) pourrait contrôler le couple (concentration en calcium-carbonate) dans la colonne d'eau pour ces deux dates, mais cela ne semble pas être le cas pour le reste de la saison.

Lorsque l'on regarde la variation de $a(\text{Ca}^{2+})$ en fonction de celle de l'ion PO_4^{3-} , une tendance se dégage : $a(\text{Ca}^{2+})$ semble diminuer de manière linéaire avec l'augmentation de l'ion PO_4^{3-} (Figure 3.20D). Cela suggère qu'une phase de phosphate de calcium avec un rapport C:P relativement faible pourrait contrôler la concentration en Ca dans notre système.

4.2.2 Spéciation du Ca dans la fraction particulaire

Pour le site de Verneuil, les phases minérales présentes dans la matière particulaire ont fait l'objet de moins d'observations en MEB et de cartographies EDXS. Pour autant, des phases cristallines de CaCO_3 , probablement de la calcite, ont pu être observées à plusieurs reprises (voir Figure 3.24). Des tests entiers ou partiels de *Phacotus* sp. ont été observés à 7 dates sur 10 (voir tableau III.VII, Tableau S3.6).

Sur les spectres IR, 4 dates (29/06, 29/09, 06 et 10/10) montrent une contribution de la calcite (Figure 3.21). Comparativement aux spectres IR obtenus sur les échantillons de Cergy, ces pics sont de faible intensité. L'analyse de la composition élémentaire du particulaire concorde avec un maximum de calcite pour la date du 29/06. L'analyse de la composition chimique de la matière particulaire (Figure 3.22) suggère également la présence d'une phase riche en Ca et P pour plusieurs dates, ce qui concorde avec la corrélation observée entre la variation de l'a(Ca^{2+}) en fonction de celle de l'ion PO_4^{3-} . Aucune phase n'a pu être identifiée en microscopie électronique à balayage, mais l'analyse de la matière particulaire s'est concentrée sur la présence/absence d'inclusions d'iACC dans les cellules de *Microcystis*. Des efforts supplémentaires pour identifier les phases porteuses de Ca présentes dans l'ensemble des échantillons seront nécessaires dans le futur.

L'ajout de calcite n'est pas nécessaire dans nos ajustements, ou de façon faible (16 % \pm 10) pour le 25/08. Pour les dates du 08 et du 25 août, 22 à 17 % du contenu particulaire total en Ca ont été attribués à du Ca-acétate. Le fait qu'on observe une mauvaise concordance entre nos ajustements et les spectres, en parallèle de fortes biomasses attribuées à une efflorescence de *Ceratium*, suggère que l'utilisation de cyanobactéries pour modéliser une dinoflagellé n'est pas concluant. Enfin, le spectre du 09 septembre est parfaitement modélisé en utilisant un polyphosphate (Ca-pyrophosphate), ce qui concorde avec nos observations précédentes. Pour chacun de ces spectres, l'utilisation de souches iACC+ pour modéliser la biomasse n'améliorait pas, ou réduisait la qualité de l'ajustement. Cela suggère que les iACC ne sont pas une phase importante dans le réservoir total de calcium pour ces dates. La spectroscopie FTIR n'a pas révélé la présence d'iACC, et ce pour aucun des échantillons à l'exception d'un où le doute subsiste (Figure 3.21C). En effet, pour l'échantillon du 13 octobre, la contribution d'un pic à 860 cm^{-1} pourrait expliquer la forme large du pic à 872 cm^{-1} . Cela pourrait suggérer la présence d'iACC dans cet échantillon en quantité suffisante pour être détecté par cette technique. Un ajustement des spectres par combinaison linéaire sera nécessaire par la suite pour appuyer cette hypothèse (voir Mehta *et al.* 2022 (33), annexe n°2).

4.2.3 Dynamique de *Microcystis* vis-à-vis de la biominéralisation d'iACC

Comme pour Cergy, des iACC ont été observés dans des cellules de *Microcystis* (MEB, STEM-HAADF et EDXS) pour 7 dates sur 10. La présence du gène *ccyA* a été détectée tout au long de l'étude, avec une valeur maximale de $2,9 \pm 0,54 \times 10^4$ copies.mL⁻¹. Si le début de la

saison (période chaude) montre une dynamique similaire à celle du site de Cergy, ce n'est pas le cas sur toute la saison. Entre le 06/10 et le 13/10 (période froide), la population totale de *Microcystis* reste importante ($> 10^4$ copies.mL⁻¹). En parallèle la proportion de la population *ccyA*⁺ dans la population totale augmente (20 ± 6 % et 48 ± 12 %). Il est difficile de discuter de paramètres qui pourraient influencer ce changement de dynamique avec seulement deux points, mais on peut noter que le Ca dissous augmente au cours du temps, et atteint 1030 μ M au 06/10. Cependant, il continue d'augmenter jusqu'au 20/10 (1094 μ M), date où la population totale de *Microcystis* a chuté à $7,3 \pm 1,1 \times 10^3$ copies.mL⁻¹.

5 Conclusions

Au sein de nos deux sites, la présence d'iACC (7 dates sur 10) et de *Microcystis* porteuse du gène *ccyA* ont pu être détectées tout au long de l'étude, confirmant que la formation d'iACC est un phénomène présent sur les périodes estivales et automnales sur ces étangs. Ces travaux confirment les observations de Gaëtan *et al.* 2022 (9), où des cellules iACC⁺ avaient été détectées dans cinq écosystèmes différents. Ce phénotype semble donc bien répandu géographiquement, mais également semble se maintenir au cours du temps.

En combinant la détection des iACC et le screening du marqueur moléculaire *ccyA*, nous pouvons déterminer la présence/absence de cellules formant potentiellement des iACC, mais aussi quantifier l'abondance relative de ces dernières dans la population totale de *Microcystis*. Une population *ccyA*⁺ est présente tout au long de la saison, même si elle reste faible par rapport à la population *ccyA*⁻ majoritaire. Il a été montré dans la littérature une très forte micro-diversité génotypique chez *Microcystis*, capables de co-exister, et même de se succéder au cours des efflorescences. Pour exemple, les souches *Microcystis* capables de produire des toxines émergeraient au début ou en pic d'efflorescence (4,40,56–59). Dans notre étude, les biomasses totales de *Microcystis* sont restées faibles, mais lorsque l'on observe une augmentation, la population *ccyA*⁺ s'est également développée, tout en restant dans des proportions faibles (≈ 10 %). Ainsi, dans les conditions dans lesquelles ont évoluées ces populations de *Microcystis*, les souches *ccyA*⁻ constituaient la part majoritaire. Lorsque la biomasse de *Microcystis* était très faible, la proportion des souches *ccyA*⁺ pouvait par contre augmenter fortement jusqu'à 60 % (± 30 %).

Dans le premier chapitre (Gaëtan *et al.* 2022) (4), nous avons estimé la proportion de souches formant des iACC dans plusieurs environnements sur la base du nombre de génomes *ccyA*⁺ dans le nombre de génomes isolés d'un même environnement lors d'un même épisode d'efflorescence. Ce ratio variait drastiquement d'un environnement à l'autre, entre 0 (Lac Champlain, Canada) et presque 100 % (Lac Pampulha, Brésil), montrant ici la très grande « flexibilité » de distribution de ce génotype, lors d'épisodes d'efflorescence. Dans un environnement proche de ceux étudiés, le site de Champs-Sur-Marne (Ile de France), ce ratio était d'environ 50 % en 2012, au pic de bloom. Ainsi, de nombreux paramètres biotiques et abiotiques pourraient influencer sur la part relative des populations *ccyA*⁺ dans ces

écosystèmes, et la comparaison d'études ponctuelles ne semble pas adéquate. Au cours de notre étude, le ratio *ccyA+*/population totale de *Microcystis* varie de 10 à 70 %, malgré l'absence d'efflorescences cette année-là.

En effet, la notion d'efflorescence en terme d'ordre de grandeur est fonction de l'écosystème étudié et de son état trophique initial : dans les grands lacs de plusieurs centaines de km de diamètre, comme le lac Erie (USA) ou Chaohu (Chine), la population de *Microcystis* peut atteindre 3×10^7 copies d'ARNr 16S. mL⁻¹ (19,60). Ici, le maximum d'abondance de *Microcystis* était aux alentours de 10^5 copies d'ARNr 16S. mL⁻¹. Si notre étude a montré la persistance de génotype *ccyA+* au cours du temps, au sein de deux plans d'eau, dans des abondances faibles, concomitant avec une faible détection de cellules avec des iACC, la biomasse totale de *Microcystis* est restée faible. En effet, l'apparition et l'intensité des efflorescences restent encore peu prédictibles, rendant difficile de prévoir un cadre d'échantillonnage. Ainsi, la question d'une biomasse minimale ou même de la dominance de *Microcystis* au sein du phytoplancton pour promouvoir l'émergence des populations *ccyA+* reste ouverte. Il serait intéressant d'explorer de façon systématique des épisodes d'efflorescences, tels que ceux du lac Pamphula, ou le ratio de souches *ccyA+*/nombre total de souches de *Microcystis* atteignait presque 100 %, avec nos outils de quantification moléculaire. Aucune information n'est donnée dans l'étude originelle sur la taille de population totale de *Microcystis* cependant. De nombreux facteurs contrôlent la dynamique des blooms de *Microcystis* : P total, N, température, ensoleillement, etc. (7,22), et dans cette population l'abondance de sous-populations distinctes (61,62). La population *ccyA+* constitue potentiellement un groupe fonctionnel à part entière.

6 Bibliographie du Chapitre 3

1. Paerl HW, Huisman J. Blooms like It Hot. *Science*. 2008;320(5872):57–8.
2. Huisman J, Codd GA, Paerl HW, Ibelings BW, Verspagen JMH, Visser PM. Cyanobacterial blooms. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(8):471–83.
3. Kosten S, Huszar VLM, Bécares E, Costa LS, van Donk E, Hansson LA, *et al*. Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Global Change Biology*. 2012;18(1):118–26.
4. Davis TW, Berry DL, Boyer GL, Gobler CJ. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*. 2009;8(5):715–25.
5. Wever AD, Benzerara K, Coutaud M, Caumes G, Poinot M, Skouri-Panet F, *et al*. Evidence of high Ca uptake by cyanobacteria forming intracellular CaCO₃ and impact on their growth. *Geobiology*. 2019;17(6):676–90.
6. Zurawell RW, Chen H, Burke JM, Prepas EE. Hepatotoxic Cyanobacteria: A Review of the Biological Importance of Microcystins in Freshwater Environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2005;8(1):1–37.
7. Harke MJ, Steffen MM, Gobler CJ, Otten TG, Wilhelm SW, Wood SA, *et al*. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae*. 2016;54:4–20.
8. Benzerara K, Duprat E, Bitard-Feildel T, Caumes G, Cassier-Chauvat C, Chauvat F, *et al*. A New Gene Family Diagnostic for Intracellular Biomineralization of Amorphous Ca Carbonates by Cyanobacteria. *Dagan T, editor. Genome Biology and Evolution*. 2022;14(3):evac026.
9. Gaëtan J, Halary S, Millet M, Bernard C, Duval C, Hamlaoui S, *et al*. Widespread formation of intracellular calcium carbonates by the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis*. *Environ Microbiol*. 2022;

10. Cam N, Benzerara K, Georgelin T, Jaber M, Lambert JF, Poinot M, *et al.* Cyanobacterial formation of intracellular Ca-carbonates in undersaturated solutions. *Geobiology*. 2018;16(1):49–61.
11. Benzerara K, Skouri-Panet F, Li J, Ferard C, Gugger M, Laurent T, *et al.* Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(30):10933–8.
12. Mehta N, Benzerara K, Kocar BD, Chapon V. Sequestration of Radionuclides Radium-226 and Strontium-90 by Cyanobacteria Forming Intracellular Calcium Carbonates. *Environ Sci Technol*. 2019;53(21):12639–47.
13. Ragon M, Benzerara K, Moreira D, Tavera R, Lopez-Garci-a P. 16S rDNA-based analysis reveals cosmopolitan occurrence but limited diversity of two cyanobacterial lineages with contrasted patterns of intracellular carbonate mineralization. *Front Microbiol*. 2014;5:1–11.
14. Horst GP, Sarnelle O, White JD, Hamilton SK, Kaul RB, Bressie JD. Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*. 2014;54:188–98.
15. Weyhenmeyer GA, Hartmann J, Hessen DO, Kopáček J, Hejzlar J, Jacquet S, *et al.* Widespread diminishing anthropogenic effects on calcium in freshwaters. *Scientific Reports*. 2019;9(1):10450.
16. Chen H, Lüring M. Calcium promotes formation of large colonies of the cyanobacterium *Microcystis* by enhancing cell-adhesion. *Harmful Algae*. 2020;92:101768.
17. Gu P, Li Q, Zhang W, Zheng Z, Luo X. Effects of different metal ions (Ca, Cu, Pb, Cd) on formation of cyanobacterial blooms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020;189:109976.
18. Wang YW, Zhao J, Li JH, Li SS, Zhang LH, Wu M. Effects of Calcium Levels on Colonial Aggregation and Buoyancy of *Microcystis aeruginosa*. *Curr Microbiol*. 2011;62(2):679–83.
19. Rinta-Kanto JM, Ouellette AJA, Boyer GL, Twiss MR, Bridgeman TB, Wilhelm SW. Quantification of Toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 Blooms in Western Lake Erie using Quantitative Real-Time PCR. *Environ Sci Technol*. 2005;39(11):4198–205.
20. Dyble J, Fahnenstiel GL, Litaker RW, Millie DF, Tester PA. Microcystin concentrations and genetic diversity of *Microcystis* in the lower Great Lakes. *Environmental Toxicology*. 2008;23(4):507–16.
21. Steffen MM, Davis TW, McKay RML, Bullerjahn GS, Krausfeldt LE, Stough JMA, *et al.* Ecophysiological Examination of the Lake Erie *Microcystis* Bloom in 2014: Linkages between Biology and the Water Supply Shutdown of Toledo, OH. *Environ Sci Technol*. 2017;51(12):6745–55.
22. Dick GJ, Duhaime MB, Evans JT, Errera RM, Godwin CM, Kharbush JJ, *et al.* The genetic and ecophysiological diversity of *Microcystis*. *Environ Microbiol*. 2021;1462-2920.15615.
23. Xiao M, Willis A, Burford MA, Li M. Review: a meta-analysis comparing cell-division and cell-adhesion in *Microcystis* colony formation. *Harmful Algae*. 2017;67:85–91.
24. Ledreux A, Thomazeau S, Catherine A, Duval C, Yéprémian C, Marie A, *et al.* Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. *Harmful Algae*. 2010;10(1):88–97.
25. Sotton B, Paris A, Le Manach S, Blond A, Duval C, Qiao Q, *et al.* Specificity of the metabolic signatures of fish from cyanobacteria rich lakes. *Chemosphere*. 2019;226:183–91.
26. Pobel D, Robin J, Humbert JF. Influence of sampling strategies on the monitoring of cyanobacteria in shallow lakes: Lessons from a case study in France. *Water Research*. 2011;45(3):1005–14.
27. Talling JF. The seasonality of phytoplankton in African lakes. In: Munawar M, Talling JF, editors. *Seasonality of Freshwater Phytoplankton: A global perspective* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 1986 [cited 2023]. p. 139–60. (Developments in Hydrobiology; vol. 1). Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-009-4818-1_10
28. Cronberg G, Annadotter H. *Manual on Aquatic Cyanobacteria: A Photo Guide and a Synopsis of Their Toxicology*. Intergovernmental Oceanographic Commission, Unesco; 2006. 116 p.
29. Demay J, Bernard C, Reinhardt A, Marie B. Natural Products from Cyanobacteria: Focus on Beneficial Activities. *Marine Drugs*. 2019;17(6):320.
30. Mehta N, Gaëtan J, Giura P, Azaïs T, Benzerara K. Detection of biogenic amorphous calcium carbonate (ACC) formed by bacteria using FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2022;121262.
31. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*. 1979;111(1):1–61.

32. Mehta N, Gaëtan J, Giura P, Azaïs T, Benzerara K. Detection of biogenic amorphous calcium carbonate (ACC) formed by bacteria using FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2022;278:121262.
33. Mehta N, Vantelon D, Gaëtan J, Fernandez-Martinez A, Benzerara K. Calcium speciation and coordination environment in intracellular amorphous calcium carbonate (ACC) formed by cyanobacteria. *Chemical Geology*. in rev.;
34. Assayag N, Rivé K, Ader M, Jézéquel D, Agrinier P. Improved method for isotopic and quantitative analysis of dissolved inorganic carbon in natural water samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006;20(15):2243–51.
35. Louati I, Nunan N, Tambosco K, Bernard C, Humbert JF, Leloup J. The phyto-bacterioplankton couple in a shallow freshwater ecosystem: Who leads the dance? *Harmful Algae*. 2023;126:102436.
36. Hugoni M, Taib N, Debros D, Domaizon I, Jouan Dufournel I, Bronner G, *et al.* Structure of the rare archaeal biosphere and seasonal dynamics of active ecotypes in surface coastal waters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(15):6004–9.
37. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*. 2019;20(4):1160–6.
38. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990;215(3):403–10.
39. Bru D, Ramette A, Saby NPA, Dequiedt S, Ranjard L, Jolivet C, *et al.* Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *ISME J*. 2011;5(3):532–42.
40. Singh S, Rai PK, Chau R, Ravi AK, Neilan BA, Asthana RK. Temporal variations in microcystin-producing cells and microcystin concentrations in two fresh water ponds. *Water Research*. 2015;69:131–42.
41. Rinta-Kanto JM, Ouellette AJA, Boyer GL, Twiss MR, Bridgeman TB, Wilhelm SW. Quantification of Toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 Blooms in Western Lake Erie using Quantitative Real-Time PCR. *Environ Sci Technol*. 2005;39(11):4198–205.
42. Best DJ, Roberts DE. Algorithm AS 89: The Upper Tail Probabilities of Spearman's Rho. *Journal of the Royal Statistical Society Series C (Applied Statistics)*. 1975;24(3):377–9.
43. Hollander M, A. Wolfe D, Chicken E. *Nonparametric Statistical Methods*. 1st ed. Wiley; 2015
44. Kansiz M, Heraud P, Wood B, Burden F, Beardall J, McNaughton D. Fourier Transform Infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. *Phytochemistry*. 1999;52(3):407–17.
45. Murdock JN, Wetzel DL. FT-IR Microspectroscopy Enhances Biological and Ecological Analysis of Algae. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2009;44(4):335–61.
46. Ravikumar P, Somashekar RK, Prakash K. A comparative study on usage of Durov and Piper diagrams to interpret hydrochemical processes in groundwater from SRLIS river basin, Karnataka, India. *Elixir Earth Sci*. 2015;80:31073–7.
47. Hall DO, Rao K. *Photosynthesis*. Cambridge University Press; 1999. 252 p.
48. Falkowski P, Kiefer DA. Chlorophyll a fluorescence in phytoplankton: relationship to photosynthesis and biomass. *Journal of Plankton Research*. 1985;7(5):715–31.
49. Aponasenko AD, Shchur LA, Lopatin VN. Relationship of the chlorophyll content with the biomass and disperse structure of phytoplankton. *Dokl Biol Sci*. 2007;412(1):61–3.
50. Valls TAD, Riba I. *CO2 Acidification in Aquatic Ecosystems: An Integrative Approach to Risk Assessment*. Elsevier; 2022. 326 p.
51. Kellermeier M, Picker A, Kempter A, Cölfen H, Gebauer D. A Straightforward Treatment of Activity in Aqueous CaCO₃ Solutions and the Consequences for Nucleation Theory. *Advanced Materials*. 2014;26(5):752–7.
52. Fukushi K, Imai E, Sekine Y, Kitajima T, Gankhurel B, Davaasuren D, *et al.* In Situ Formation of Monohydrocalcite in Alkaline Saline Lakes of the Valley of Gobi Lakes: Prediction for Mg, Ca, and Total Dissolved Carbonate Concentrations in Enceladus' Ocean and Alkaline-Carbonate Ocean Worlds. *Minerals*. 2020;10(8):669.
53. Caumartin J, Benzerara K, Havas R, Thomazo C, Lòpez-García P, Duprat E. The chemical conditions necessary for the formation of microbialites. *Geochem Persp Lett*. 2023;25:30–5.
54. Gruenert U, Raeder U. Growth responses of the calcite-loricated freshwater phytoflagellate *Phacotus lenticularis* (Chlorophyta) to the CaCO₃ saturation state and meteorological changes. *Journal of Plankton Research*. 2014;36(3):630–40.

55. Lenz S, Raeder U, Geist J. Representative monitoring of the calcifying alga *Phacotus lenticularis* (Chlamydomphyceae) in lentic ecosystems: Representative monitoring of calcifying algae. *J Limnol.* 2020;79(2):1.
56. Park HD, Watanabe MF, Harada KI, Nagai H, Suzuki M, Watanabe M, *et al.* Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. *Natural Toxins.* 1993;1(6):353–60.
57. Briand E, Bormans M, Gugger M, Dorrestein PC, Gerwick WH. Changes in secondary metabolic profiles of *Microcystis aeruginosa* strains in response to intraspecific interactions. *Environmental Microbiology.* 2016;18(2):384–400.
58. Briand E, Escoffier N, Straub C, Sabart M, Quiblier C, Humbert JF. Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. *ISME J.* 2009;3(4):419–29.
59. Bozarth CS, Schwartz AD, Shepardson JW, Colwell FS, Dreher TW. Population Turnover in a *Microcystis* Bloom Results in Predominantly Nontoxic Variants Late in the Season. *Applied and Environmental Microbiology.* 2010;76(15):5207–13.
60. Yu L, Kong F, Zhang M, Yang Z, Shi X, Du M. The Dynamics of *Microcystis* Genotypes and Microcystin Production and Associations with Environmental Factors during Blooms in Lake Chaohu, China. *Toxins.* 2014;6(12):3238–57.
61. Monchamp ME, Pick FR, Beisner BE, Maranger R. Nitrogen Forms Influence Microcystin Concentration and Composition via Changes in Cyanobacterial Community Structure. *PLOS ONE.* 2014;9(1):e85573.
62. Smith DJ, Berry MA, Cory RM, Johengen TH, Kling GW, Davis TW, *et al.* Heterotrophic Bacteria Dominate Catalase Expression during *Microcystis* Blooms. Nojiri H, editor. *Appl Environ Microbiol.* 2022;88(14):e02544-21.
63. Plummer LN, Busenberg E. The solubilities of calcite, aragonite and vaterite in CO₂-H₂O solutions between 0 and 90°C, and an evaluation of the aqueous model for the system CaCO₃-CO₂-H₂O. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 1982;46(6):1011–40.
64. Zeyen N, Benzerara K, Beyssac O, Daval D, Muller E, Thomazo C, *et al.* Integrative analysis of the mineralogical and chemical composition of modern microbialites from ten Mexican lakes: What do we learn about their formation? *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 2021;305:148–84.
65. Brečević L, Nielsen AE. Solubility of amorphous calcium carbonate. *Journal of Crystal Growth.* 1989;98(3):504–10.

Chapitre 4 Expression du gène marqueur de la biominéralisation selon un cycle jour/nuit

Le dernier chapitre de cette thèse porte sur des contrôles moléculaires potentiels de la biominéralisation de carbonate de calcium amorphe intracellulaire au sein d'une souche de *Microcystis*. Ces travaux ont débuté au cours de mon Master 2. Ils visaient à effectuer un suivi de cultures de souches de *Microcystis* formant ou non des iACC et possédant ou non le gène *ccyA*, et de déterminer l'effet de différentes concentrations en calcium sur le taux de croissance de *Microcystis* selon le phénotype et le génotype. Les travaux de De Wever *et al.* (2019) (1) ont en effet montré que certaines cyanobactéries formant des iACC, cultivées dans un milieu standard (BG11) contenant 250 μM de Ca^{2+} , montraient des taux de croissance significativement plus rapides que lorsqu'elles étaient cultivées avec 50 μM de Ca^{2+} . Nous souhaitions donc tester si la concentration initiale en calcium dissous pouvait limiter la croissance des souches de *Microcystis*, et si oui, si cette limitation pouvait être corrélée à la présence du gène *ccyA*. En parallèle, un suivi de l'expression du gène *ccyA* par RT-qPCR était envisagé au cours des différents phases de croissance. Cependant, ces travaux ont été fortement impactés par le premier confinement suite à la pandémie de la COVID-19, et les échantillons n'ont pas été analysés. Cependant, ils ont été stockés à -80°C et pourront être analysés dans le futur

Ainsi, nous avons ré-orienté notre approche en collaboration avec Elodie Duprat, experte en bio-informatique (Maître de conférences à Sorbonne Université) et Apolline Bruley (à l'époque doctorante). Le but était dans un premier temps de répertorier les jeux de données de transcriptomique de *Microcystis* (*i.e.* expression des gènes d'un organisme) et métranscriptomique (*i.e.* expression des gènes d'une communauté d'organismes). En effet, comme ces études portent sur les transcrits totaux sans a priori, nous pouvions explorer *a posteriori* la présence, et l'expression du gène *ccyA* dans l'ensemble de ces données. Le genre *Microcystis* est abondamment étudié (2–4), et de nombreuses études omiques étaient disponibles (voir Tableau IV.1). Afin de pallier les divergences méthodologiques entre les différentes études sélectionnées, nous avons mis en place un protocole standard de traitement des données issues d'un séquençage des ARN. Ce protocole a servi de base à celui utilisé dans ce chapitre, qui sera décrit ultérieurement.

Tableau IV.I Résumé des études sélectionnées pour les analyses bio-informatiques

T = transcriptomique, MT = métatranscriptomique.

Auteur(s)	Méthode	Technique(s)	Souche(s)/Provenance	Condition(s)
Chen <i>et al.</i> 2017 (5)	MT	Illumina HiSeq2500 <i>single read</i> 65 bp	Lac Taihu (Chine)	Pas de variation des conditions
Davenport <i>et al.</i> 2019 (6)	MT	Illumina HiSeq2500 <i>pair-end</i> 2 x 150 bp	Lac Erie (USA)	Cycle jour/nuit
Thèse de C.Panrace (7)	T	Illumina HiSeq2500 <i>single read</i> 65 bp	Souches <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC_7806, PCC_9432 et PCC_9809 (Collection Pasteur)	Cycle jour/nuit
Harke <i>et al.</i> 2016 (8)	MT	Illumina HiSeq2000 <i>single read</i> 100 bp	Lac Erie (USA)	Gradient de nutriment
Harke <i>et al.</i> 2017 (9)	T	Illumina HiSeq2000 <i>single read</i>	Souche <i>Microcystis aeruginosa</i> LE-3 (Lac Erie)	Broutage par Daphnies
Harke et Glober 2013 (10)	T	Illumina HiSeq2000 <i>single read</i> 100 bp	Souche <i>Microcystis aeruginosa</i> LE-3 (Lac Erie)	Stress en N et P, croissance sur matière organique
Harke et Glober 2015 (11)	T	Illumina HiSeq2000 <i>single read</i> 100 bp	Souche <i>Microcystis aeruginosa</i> LE-3 (Lac Erie)	Disponibilité en N
Morimoto <i>et al.</i> 2018 (12)	T	Illumina MiSeq <i>pair-end</i> 2x75 bp	Souche <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-298 (Collection du National Institute for Environmental Studies (Japon))	Infection par le phage Ma-LMM01
Pascault <i>et al.</i> 2021 (13)	MT	Illumina HiSeq2000 <i>single read</i> 100 bp	Lac Champs-Sur-Marne (France)	Cycle jour/nuit
Penn <i>et al.</i> 2014 (14)	MT	Illumina Genome Analyzer IIx <i>pair-end</i>	Lac eutrophisé (Singapour)	Cycle jour/nuit
Straub <i>et al.</i> 2011 (15)	T	Puce à ADN	Souche <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 (Collection Pasteur)	Cycle jour/nuit
Steffen <i>et al.</i> 2014 (16)	T	Illumina MiSeq <i>single read</i>	Souche <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-298 (Collection du National Institute for Environmental Studies (Japon))	Stress en N et P

Ce travail a permis une première étude de l'expression du gène *ccyA* et de ses voisins génomiques en fonction de différentes conditions. En premier lieu, nous avons détecté la présence et l'expression du gène *ccyA* dans plusieurs jeux de données environnementales (*i.e.* metatranscriptomique, MT dans le tableau IV.I), mais avec des seuils d'expression très faibles, jusqu'à dix fois moins que dans les jeux de données en transcriptomique (T dans le tableau IV.I). Les données issues du séquençage d'une communauté microbienne sont en effet plus complexes à étudier, puisque présentant une forte diversité génomique. La nature même du génome de *Microcystis*, extrêmement plastique et avec une organisation mosaïque (Humbert *et al.* 2013) constitue un frein pour l'analyse des données de séquençage.

Nous avons donc choisi de restreindre l'étude aux jeux de données issus de souches en culture uniquement, pour nous affranchir de ces difficultés. Parmi les 7 jeux de données, l'expression du gène *ccyA* a été détectée dans 6, testant l'impact du cycles jour/nuit (15), de la disponibilité en nutriments (10), de la réponse au broutage (9) ou encore l'infection par un phage (12). Des expériences menées sur une autre cyanobactérie, *Gloeomargarita lithophora* (17) ont montré une incorporation préférentielle d'alcalino-terreux dans les iACC le jour, et dans les polyphosphates la nuit (travaux de M.Coutaud (IMPMC), non publié). Sur la base de ces travaux, nous avons donc choisi de nous concentrer sur une étude portant sur l'effet du cycle jour/nuit : l'étude menée par C. Pancrace dans le cadre de sa thèse. Dans le cadre d'une collaboration avec Muriel Gugger (Institut Pasteur), nous pouvions utiliser les données brutes pour étudier l'expression du gène *ccyA*.

La thèse de Claire Pancrace, soutenue en 2017 et co-encadrée par Muriel Gugger (Institut Pasteur) et Jean-François Humbert (INRA, iEES-Paris) portait sur les nouvelles perspectives offertes par les molécules produites par des cyanobactéries d'eau douce et l'étude des clusters de gènes impliqués dans cette production. Dans ce contexte, des outils de séquençage à haut débit (RNA-Seq) ont été utilisés pour mettre en évidence l'expression des produits naturels par plusieurs souches de *Microcystis*, issues de la collection de cyanobactéries de Pasteur (PCC) : PCC 7806, PCC 9432 et PCC 9809. Ces trois souches ont été sélectionnées selon la présence ou non au sein de leurs génomes de divers clusters de produits naturels. Ce qui fut particulièrement intéressant pour nous dans cette étude, est que les souches choisies présentent aussi des génotypes et phénotypes distincts vis-à-vis de la formation d'iACC : une souche *ccyA*⁺ connue pour former des iACC (PCC 7806) (18), une souche *ccyA*⁺ connue pour ne pas former d'iACC dans les conditions que nous utilisons usuellement et dans le BG11 notamment (PCC 9432) (18), et une souche *ccyA*⁻ (PCC 9809) (Figure 4.1). Les souches ont été cultivées selon un cycle jour/nuit de 11h/13h, avec un échantillonnage étalé sur un cycle de 24h (voir Figure 4.1).

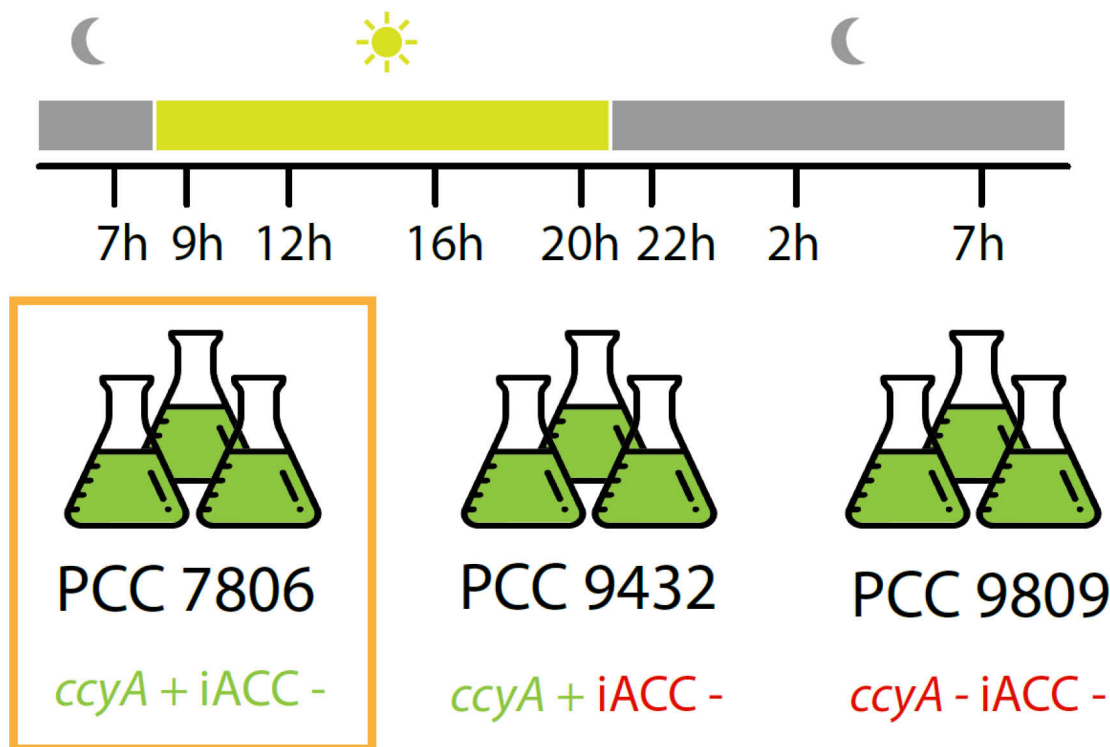


Figure 4.1 Design expérimental de l'étude de l'expression génique de *Microcystis* (travaux de C. Pancrace). La souche PCC 7806 étudiée dans ce chapitre de thèse est entourée en orange.

Nous avons ainsi développé un pipeline d'analyse bio-informatique à partir des données brutes issues du séquençage de type RNA-Seq. Dans un premier temps, l'abondance des transcrits de *ccyA*, des gènes voisins de *ccyA* et d'autres gènes du génome (en abondance moyenne de transcrits) ont été quantifiés via l'outil Salmon (19). A la différence de l'outil utilisé par C. Pancrace, Salmon utilise un pseudo-alignement et non un alignement classique. Brièvement, pour quantifier l'abondance des lectures en RNAseq, deux approches sont possibles. L'alignement décrit le fait de mettre en correspondance les lectures obtenues avec un génome ou un transcriptome de référence, et de compter les lectures localisées et associées à chaque transcrit. L'objectif étant de déterminer l'origine génomique spécifique de chaque lecture. En pseudo-alignement, on s'affranchit de la localisation des lectures en mettant en correspondance les lectures brutes avec un ensemble de séquences de référence. Cela présente l'avantage d'être plus rapide et moins coûteux en mémoire que l'alignement (20). De plus, Salmon a une meilleure sensibilité de détection que les autres méthodes existantes (19). Dans un second temps, une analyse d'expression différentielle a permis de comparer l'abondance de transcrits (*i.e.* la quantité d'expression) de chaque gène (DiCoExpress) (21). Dans cette étude, nous focalisons nos travaux sur la souche *Microcystis* PCC 7806, les données de séquençage de PCC 9432 étant moins reproductibles (*i.e.* plus grande variabilité entre chaque réplica que pour PCC 7806).

Cette étude se concentre donc sur (i) est-ce que le gène *ccyA* est exprimé chez une souche formant des *iACC* ? Si oui, (ii) est ce que l'expression varie sur le cycle jour/nuit ? Et

(iii) peut-on identifier d'autres partenaires moléculaires potentiels de ccyA sur la base d'une co-expression ?

Le traitement bio-informatique fait partie des travaux de thèses d'Apolline Bruley dirigés par Elodie Duprat, avec lesquelles j'ai travaillé étroitement pour l'analyse des résultats, la contextualisation et la rédaction, ce qui a donné lieu à l'écriture d'un article en préparation pour la publication, présenté ci-dessous.

Diel changes in the expression of a marker gene for intracellular CaCO₃ biomineralization in *Microcystis* strains

Gaëtan J*, Bruley A.*, Gugger M, Pancrace C, Millet M, J-F. Humbert, Leloup J, Benzerara K, Duprat E.

* = equal contribution

For submission to PCI Microbiology

1 Introduction

Biomineralization is widespread in all domains of life (22). In some cases, this process is tightly controlled by specific genes, as it has been documented in various eukaryotic organisms (23–25), but far less extensively in prokaryotes (26,27). Biomineralization in eukaryotes, particularly marine organisms, is a tightly regulated process involving an array of molecular actors (28,29). Key genes, such as carbonate anhydrase (30,31), Ca²⁺, H⁺ and inorganic carbon transport genes (32), or genes coding for molecules inhibiting mineralization (33,34), have been identified to play pivotal roles in controlling the precipitation of calcium carbonate (CaCO₃) in eukaryotic organisms. In bacteria, until recently, the only well documented case of controlled biomineralization is the formation of magnetite (Fe₃O₄) and/or greigite (Fe₃S₄) by magnetotactic bacteria (35). The precise synthesis of magnetosomes, intracellular organelles containing magnetic minerals, is regulated by a suite of more than 40 genes involved in the control of size, shape, and crystallography of the mineral phases (36–38).

In cyanobacteria, the usual paradigm is that the biomineralization of calcium carbonate occurs as an indirect by-product of photosynthesis, with no apparent involvement of genes specific to this process (39). Yet, some species of cyanobacteria are able to synthesize intracellular amorphous calcium carbonates (iACC) in a genetically controlled manner (40,41). This capacity is particularly widespread among the well-studied *Microcystis* genus (42). This cyanobacterium can bloom, with some ecotypes being toxic for human and wildlife (2), and cause numerous problems in freshwater ecosystems (3). Moreover, the formation of iACC by the large biomasses of *Microcystis* populations during bloom periods may have a significant impact on the local geochemical cycle of calcium in these environments (42).

The formation of iACC by cyanobacteria costs some energy to the cells (1,43) and a genetic control was proposed (41). Using a comparative genomic approach, the gene family *ccyA* was discovered and appeared as a marker gene for the biomineralization of iACC in cyanobacteria (18). The protein encoded by this gene, called calcyanin, lacks detectable full-length homologs with known function. Therefore, we still ignore the function of this gene/protein family. Yet, a number of clues suggest that calcyanin plays a role in calcium homeostasis (18,44).

The overexpression of *ccyA* in iACC-lacking mutant cyanobacteria did not result in the formation of iACC (18). This observation and general considerations about what is needed for the formation of iACC suggest it likely involves several other genes (18,45,46). These genes may not be specific to this biomineralization function and/or may not be shared by all iACC-forming cyanobacteria. For example, iACC inclusions form in cyanobacteria within an intracellular compartment of unknown chemical composition (46). Such a compartmentalization may serve as a way to achieve chemical conditions allowing the precipitation and the stabilization of ACC with some genetic control to be identified. Examples of molecular processes that may favor iACC precipitation are carbon-concentrating mechanisms (CCMs) (42), which have been abundantly described in cyanobacteria and involve diverse genes (47). Similarly, Ca^{2+} transport genes may also be involved in the high accumulation of Ca within iACC (1). Interestingly, the *ccyA* gene colocalizes and/or its presence was correlated with genes involved in the transport and homeostasis of Ca^{2+} and inorganic carbon.

Overall, one way of gaining a better understanding of the molecular mechanisms involved in iACC biomineralization is to look at the expression of the *ccyA* gene together with all other genes mentioned above. The diurnal light/dark cycle is an important parameter driving large variations of gene expression in cyanobacteria (48–50). For example, the diurnal cycle influences the expression of numerous genes involved in key cellular processes such as photosynthesis, carbon fixation, nitrogen metabolism, and circadian rhythms. Therefore, here, we investigated the expression of the overall genome of one strain of *Microcystis* (PCC 7806), harboring *ccyA* gene and forming iACC, during a 24h day/night cycle. In particular, we assessed whether the expression of genes involved in CCM and Ca transport might be correlated with that of the *ccyA* gene.

2 Materials and methods

2.1 Cultures and sampling.

The culture, sampling, nucleic extraction, and RNA sequencing were carried out at the PCC (Pasteur Cyanobacterial Collection) at Pasteur Institute in 2017, during the PhD thesis of C. Pancrace. A preculture of *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 was grown at 22°C in 40 mL of the BG11 growth medium (51) amended with NaHCO_3 (0.04 g.L⁻¹ final concentration) under a 13/11h light/dark cycle. Then, the culture was transferred into three independent separate flasks (named A, B and C). The triplicate culture were progressively transferred into 1250 mL of fresh BG11 medium supplemented with 20 mM NaHCO_3 and synchronized in an INFORS incubator under the same light/dark cycle and temperature conditions. Synchronization involved three consecutive transfers, aiming for an optical density (OD) of 0.05 before sampling. Sampling was performed during the mid-exponential phase (OD of 0.6-0.7) for each biological replicate, over a period of 24h at 8 different time points: (i) at 7 am, 60 min before the transition from dark to light, i.e. during the night (t1_N); (ii) 9 am, i.e. 60 min after the transition from dark to light, i.e., during the day (t2_D); (iii) 12 am (t3-D); (iv) 4

pm (t4_D); (v) 8 pm, 1 h before the transition from light to dark (t5_D); (vi) 10 pm, *i.e.* 60 min after the transition from light to dark (t6_N); (vii) 2 am, *i.e.* the middle of the night (t7_N), and (viii) in the end of the night period (t8_N). In this cycle, t8_N is equivalent to t1_D but in the next 24-h cycle. The sampling procedure involved the removal of 150 mL of culture, which were then centrifuged, rinsed with sterile water, and centrifuged again. The resulting pellets were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further processing. To minimize batch effects, the samples were randomized before subsequent processing.

2.2 Nucleic acid extraction.

RNA extraction was carried out using Trizol reagent (Life Technologies) and the NucleoSpin miRNA kit (Macherey-Nagel). Firstly, 1 mL of preheated Trizol (65°C) was added to the frozen pellets and incubated at 65°C for 12 minutes with vortexing at three intervals. After centrifugation (10 min at 4°C and 12,000 rcf), the upper phase was transferred to a new tube and mixed with 500 µL of preheated (65°C) Trizol. RNA extraction was achieved by adding 400 µL of chloroform, and incubating samples for 3 min at room temperature before centrifugation (10 min 4°C 12000 rcf). The upper phase was again transferred to a new tube for extraction with 400 µL of Trizol and 400 µL of chloroform with similar incubation and centrifugation conditions. The upper phase obtained from this step was then subjected to further processing using the NucleoSpin miRNA kit according to the manufacturer's instructions. The final purified RNA was eluted in 20 µL of RNase/DNase-free sterile water. The absence of genomic DNA contamination was confirmed by PCR targeting the 16S rRNA gene using specific primers. The quality and quantity of RNA were assessed using a Nanodrop spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) and a Bioanalyzer (Agilent) with RNA Nano chips.

2.3 Library Preparation and RNA Sequencing.

Library preparation was conducted using the TruSeq Stranded mRNA sample preparation kit (Illumina, San Diego, California) following the manufacturer's instructions. Ribosomal RNA (rRNA) depletion was performed using the Ribo-Zero rRNA removal kit (bacteria, #MRZB12424, Illumina) with 5 µg of total RNA. The rRNA-depleted RNA was then fragmented using divalent ions at high temperature. The resulting fragmented RNA samples were reverse-transcribed using random primers, followed by complementary-strand synthesis to generate double-stranded cDNA fragments. There was no need for an end repair step in this process. A 3'-end Adenine was added, and specific Illumina adapters were ligated to the cDNA fragments. The ligated products were amplified by PCR. The quality of the resulting oriented libraries was assessed using Bioanalyzer DNA1000 Chips (Agilent, # 5067-1504) and quantified using spectrofluorimetry (Quant-iT™ High-Sensitivity DNA Assay Kit, #Q33120, Invitrogen). Sequencing was performed on the Illumina HiSeq2500 platform of Pasteur Institute, generating single-end 65 bp reads with strand specificity. Each lane of sequencing accommodated a mixture of 18 multiplexed samples.

2.4 Read processing. Raw

RNA-seq reads were cleaned of adapter sequences and low-quality sequences using an in-house program (https://github.com/baj12/clean_ngs). Only sequences of at least 25 nt in length were considered for further analysis. Transcript abundance was quantified from the cleaned read dataset using the Salmon software (19). Pseudo-mapping of reads was done considering the coding sequences (CDS, including pseudogenes) of the complete RefSeq genome assembly of *M. aeruginosa* PCC 7806SL as a reference (GCF_002095975.1). For each replicate, total raw abundance data per transcript were obtained after normalization by transcript size, genome size (number of CDS) and sample size (number of reads).

2.5 Differential expression analysis.

Total abundance data were further processed using the DiCoExpress R-script-based tool (21) in order to detect differentially expressed genes between different time points. First, normalization was achieved using Trimmed Mean of the M-value (52). During this procedure, 220 low-count transcripts were discarded, resulting in a total of 4440 genes with normalized counts. Then, a generalized linear model was set to test a differential expression between the time points. For comparison between each time point, statistics of differential gene expression are provided as Fold Change (FC) and P-values.

2.6 Gene functional annotation.

In addition to the annotations provided by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline for the genome assembly of *M. aeruginosa* PCC 7806SL (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_002095975.1), protein sequences translated from CDS were processed using DeepNOG protein orthologous groups assignment (53) as implemented in the Genovi tool (54). An orthologous group with a COG accession number is assigned to each gene, as well as a confidence score ranging within [0,1]. The stringent threshold was set at 0.8. Orthologs of genes involved in carbon-concentrating mechanisms and Ca transport were specifically detected as bidirectional best blastp hits using protein sequence queries described in Tang *et al.* 2022 (15 genes from *Synechocystis* sp. PCC 6803, *ecaA* from *Anabaena* PCC 7120) and De Wever *et al.* 2019 (1) (13 genes from *Chroococciopsis thermalis* PCC 7203) respectively. The following thresholds were used: E-value cut-off of 1E-6, $\geq 30\%$ identity and 70% coverage.

3 Results

3.1 Overall expression pattern

A principal component analysis (PCA) was performed on the transcripts abundance of the 4440 genes, for each replicate at each sample time (Figure 4.2). All the data points were projected onto a two-dimensional plane defined by the first two axes, which accounted for 64.69% of the total variance (see Figure 4.2). Each replicate from each three independent culture showed only minor variation between them and were distinctly separated from the

time point replicates. Furthermore, the resulting plot exhibited a clear separation between night (N) and day points (D).

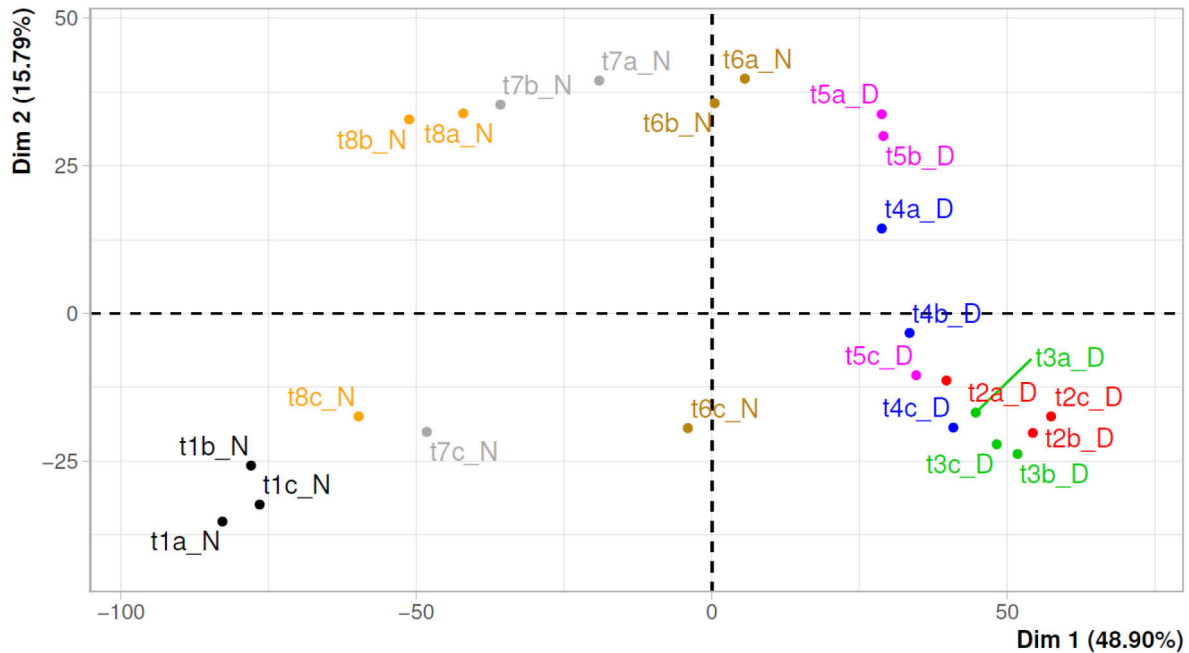


Figure 4.2 Principal component analysis of the transcript abundances of 4440 *M. aeruginosa* genes during the day/night cycle. Abundances are expressed as log base 2 of the normalized counts, for each replicate (a-c) at each sampling time (t1-t8). The 24 samples are projected onto the two first principal components (Dim. 1 and Dim. 2), explaining 48.9% and 15.8% of the variability of the dataset, respectively. Samples/replicates collected at different times over the day/night cycle appear with a different color code.

3.2 Expression of the *ccyA* gene

In order to analyze the expression profile for the *ccyA* gene during the 24-h light/dark cycle, we plotted the normalized expression of all time point replicates (Figure 4.3). The expression of day time points (t2_D to t5_D) did not significantly differ between each other, but were significantly different (p -value < 0,01) from t7_N and t8_N, respectively (Table IV.III). The t6_N time point did not significantly differ from any others except the time point t3_D (p -value < 0,05), and can therefore be considered as a transition point between day and night. A clear day/night pattern can thus be observed, with a maximum transcript abundance at the end of the night (7 am, t8_N, Table IV.II) and a minimum transcript abundance at 12 am during daytime (t3_D, Table IV.II). When compared to the mean expression of the 4440 genes, the mean expression of the *ccyA* gene showed a significant difference (p -value < 0,05) at two-time point: 2 am (t7_N) and the final 7 am (t8_N) points (Table IV.II).

3.3 Search of differential gene expression during the day/night cycle

Subsequently, a comprehensive analysis was conducted throughout the genome to

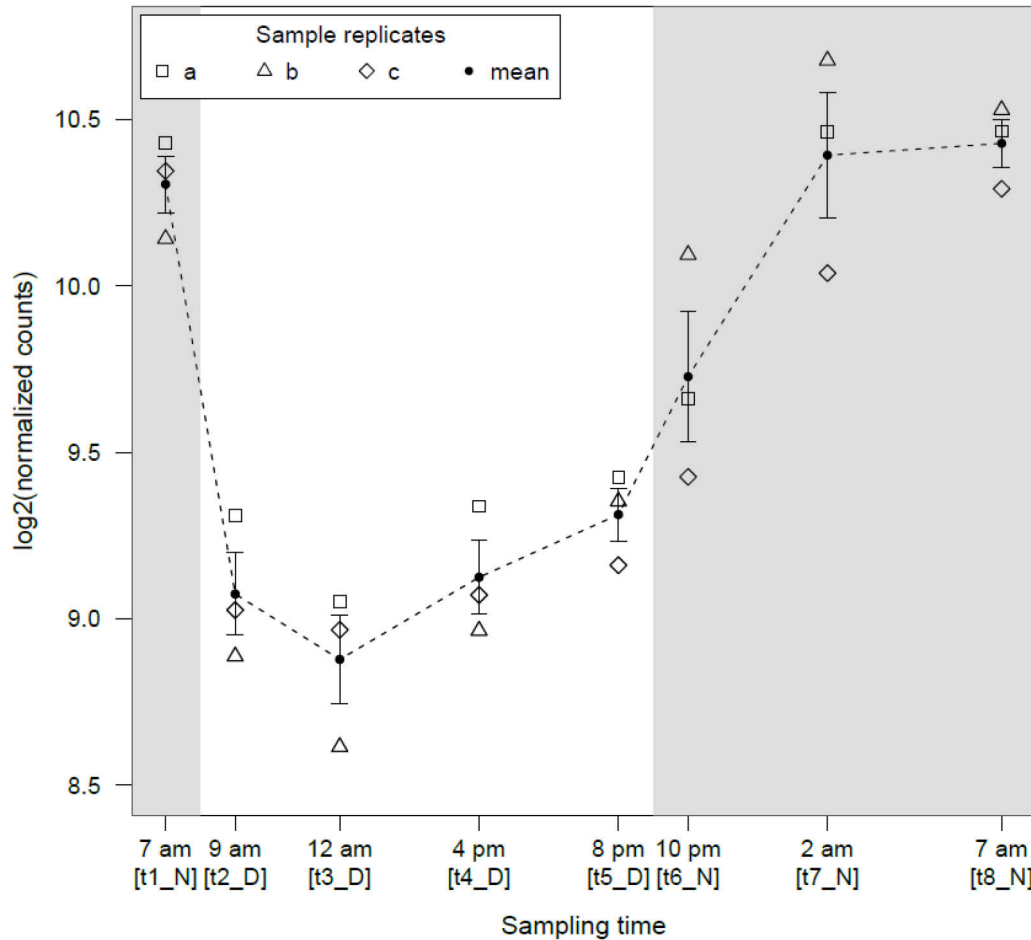


Figure 4.3 Abundance profile of *ccyA* transcript during the day/night cycle. Abundances are expressed as log base 2 of the normalized counts. For each sampling time (t1-t8), error bar represents the standard error on the mean of the three replicates. Grey areas represent the night periods during the day/night cycle.

identify genes exhibiting diurnal variation in their expression, using the minima and maxima of *ccyA* gene expression (t3_D and t6_N) as reference time points. Overall, 1799 of the 4440 total genes showed a significant difference in expression (fold change of 1) between 12 am (t3_D) and the end of the night at 7 am (t8_N) (see Figure 4.4). Among these 1799 genes, 906 were significantly over-expressed at 12 am (t3_D) than at 7 am (t8_N), and in reverse 893 were over-expressed at 7 am (t8_N).

Figure 4.4 provides the annotations for the genes with the most substantial expression differences between these two time points. Genes over-expressed during the day included a NAD(P)H-quinone oxidoreductase and a protein of the UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase family. The over-expressed genes at night included two hypothetical proteins, a protein of unknown function containing a helix-turn-helix domain, a protein from the SDR oxidoreductase family, and a dihydroorotate dehydrogenase-like protein.

Table IV.II. Transcript abundance comparison between ccyA and the whole transcriptome, for each time point. Abundances are expressed as log base 2 of the normalized counts. When means significantly differ, P-values of Wilcoxon signed rank test with continuity correction are depicted as follows: (*): 0.01 – 0.05, (.): 0.05 – 0.1.

	t1_N(.)	t2_D	t3_D	t4_D	t5_D(.)	t6_N(.)	t7_N(*)	t8_N(*)
Mean (ccyA gene, 3 replicates)	10.31	9.07	8.88	9.12	9.31	9.73	10.39	10.43
Standard deviation (ccyA gene, 3 replicates)	0.15	0.22	0.23	0.19	0.14	0.34	0.33	0.12
Mean (4440 genes, 3 replicates)	6.87	7.35	7.39	7.44	7.44	7.36	7.23	7.18
Standard deviation (4440 genes, 3 replicates)	3.79	2.45	2.57	2.67	2.61	2.87	3.21	3.33

Table IV.III. Pairwise comparisons of ccyA transcript abundance at different time points. Abundances are expressed as log base 2 of the normalized counts. Each time point is represented by n=3 replicates. The P-values of two-side pairwise t-tests are indicated and highlighted when significant (* and ** for P-values between 0.01 and 0.05, and below 0.01, respectively).

	t2_D	t3_D	t4_D	t5_D	t6_N	t7_N	t8_N
t1_N	2.0e-03**	1.7e-03**	1.4e-03**	1.1e-03**	8.1e-02	0.70	0.33
t2_D		0.34	0.78	0.19	5.8e-02	6.5e-03**	2.0e-03**
t3_D			0.23	6.2e-02	2.8e-02*	3.9e-03**	1.9e-03**
t4_D				0.25	7.1e-02	8.1e-03**	1.3e-03**
t5_D					0.16	1.7e-02*	4.9e-04**
t6_N						7.0e-02	5.6e-02
t7_N							0.87

3.4 Genomic neighborhood of *ccyA*

Figure 4.5 displays the representation of the 20 genes (18 genes and 2 pseudo-genes) located upstream (10 genes) and downstream (10 genes) of *ccyA*. This number of 20 genes was set arbitrarily and considered as a close neighborhood. When available, the functional annotations were extracted from the NCBI RefSeq database (see Table IV.IV). In this database, the *ccyA* gene is incorrectly annotated as a gene coding for the cell envelope biogenesis protein OmpA (18). Interestingly, three transposition elements were found near the *ccyA* gene: an ISL3 family and an IS1 family transposases, both pseudo-genes located at -6 and -5 genes compared to *ccyA*, and an IS1634 family transposase located at +2 genes compared with *ccyA*. The gene located directly upstream of *ccyA* was annotated as a domain-of-unknown-function (DUF)-containing protein (DUF5132), and the one directly downstream as a calcium/proton exchanger (*cax*), previously characterized in eukaryotes (55,56).

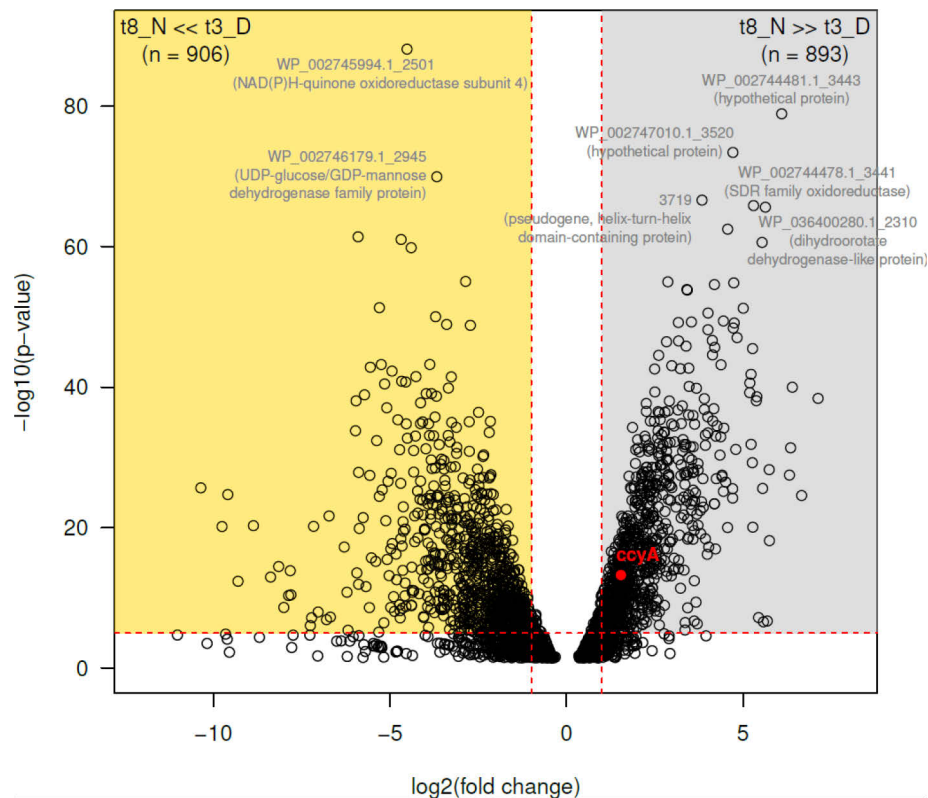


Figure 4.4 Differential abundance analysis of *ccyA* transcripts between sampling time t3_D (12 am, middle of the light period) and t8_N (7 am, end of the dark period). Log base 2 of the fold change (FC) values (x-axis) are defined for 3116 CDS. CDS with a negative log₂(FC) value correspond to transcripts significantly more abundant at 12 am (t3_D) rather than at 7 am (t8_N) (gold area; 906 CDS). CDS with a positive log₂(FC) value correspond to transcripts significantly more abundant at 7 am (t8_N) rather than at 12 am (t3_D) (grey area; 893 CDS). The *ccyA* gene is indicated by a red dot. The horizontal red dashed line indicates the P-value significant threshold after Bonferroni correction ($-\log_{10}(P\text{-value})=5$). The vertical red dashed lines indicate FC=2 and FC=0.5, e.g. 2-fold abundance ratio between the two sampling times. RefSeq accessions and annotations are indicated for CDS with $P < 2.0 \times 10^{-66}$. See Suppl. Table S1a-b for details.

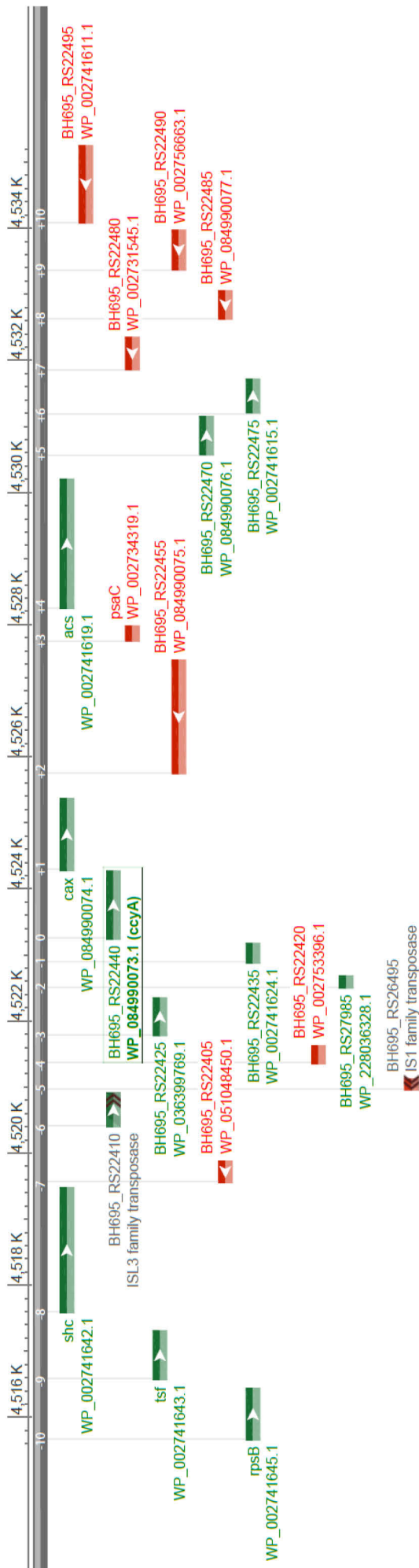


Figure 4.5 Schematic representation of the *ccyA* gene neighborhood in *M. aeruginosa* PCC 7806SL complete genome assembly. RefSeq protein accession, gene name (if defined) and locus tag are indicated for the 10 CDS located upstream (-10 to -1) and the 10 CDS located downstream (+1 to +10) with respect to *ccyA*. This genomic region spans within the nucleotide position interval [4515650, 4535259] in the NCBI genome assembly NZ_CP020771.1. CDS boundaries and features correspond to RefSeq annotations (GCF_002095975.1). See Table 3 for details.

3.5 Co-expression of other genes with *ccyA* gene

The expression profile of genes exhibiting a significant difference in their circadian expression between daytime (t3_D, 12 am) and nighttime (t8_N, 7 am) was compared to that of the *ccyA* gene (Figure 4.6). As a result, two subsets were identified: on one hand, 773 genes showed a positive correlation with the expression pattern of *ccyA* (with a Pearson correlation coefficient $\rho > 0.75$, grey subset in Figure 4.6, see Figure S1); on the other hand, 706 displayed a negative correlation with the expression pattern of *ccyA* ($\rho < 0.75$, yellow subset in Figure 4.6, see Figure S1). Figure 4.6 displays the significance level (p-value) of the correlation of the expression profile between these 1479 and *ccyA*, and provides annotation for the genes with the most significant correlation.

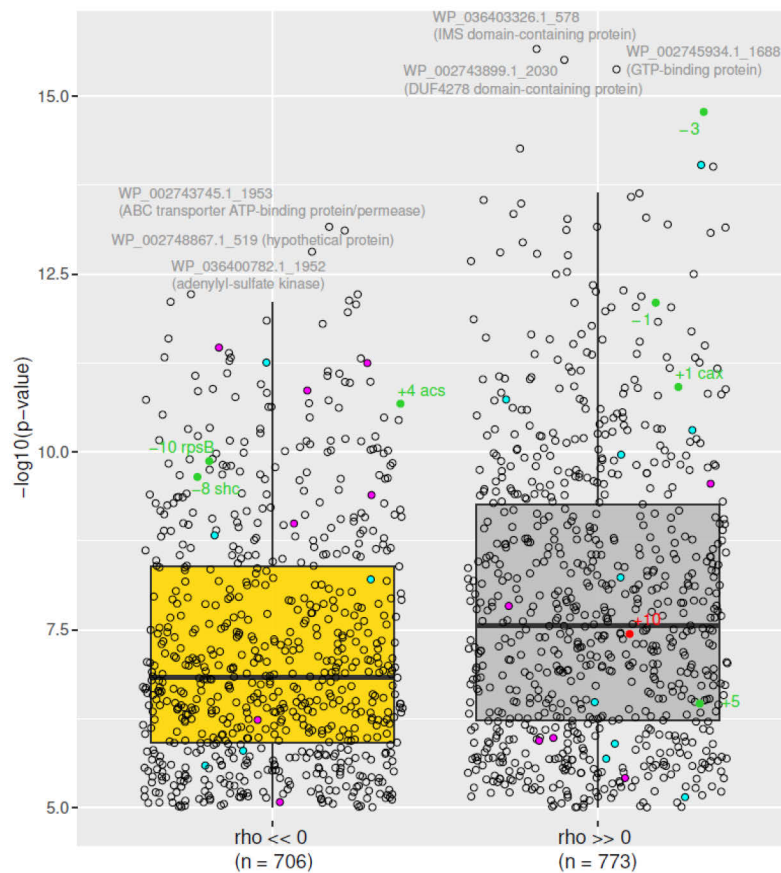


Figure 4.6 CDS with a *ccyA*-correlated transcript abundance profile during the day/night cycle. The Pearson correlation coefficient is significantly negative for 706 CDS (left). The Pearson correlation coefficient is significantly positive for 773 CDS (right). For the whole distribution of correlation coefficients over the 4440 CDS, see Suppl. Figure S1. RefSeq accessions and annotations are indicated for the 3 CDS with strongest negative and positive correlation. See Suppl. Table S2a-b for details. CDS belonging to the carbon concentrating mechanism or the Ca transport system are represented as magenta and cyan dots, respectively. CDS located in the [-10, +10] neighborhood of *ccyA* (see Table 3 and Figure 4) are represented by green and red dots (for positive and negative DNA strands, respectively). The *cax* gene located at +1 also belongs to the Ca transport system (see Suppl. Table S3b for details).

The genes most significantly correlated with the *ccyA* expression profile were: (i) an intermembrane mitochondrial space (IMS) domain-containing protein, (ii) a GTP-bonding protein, and (iii) a DUF-containing protein. The genes the most significantly anticorrelated with *ccyA* expression profile were annotated as (i) an ABC transporter ATP-binding protein/permease, (ii) an adenylyl-sulfate kinase, and (iii) a hypothetical protein.

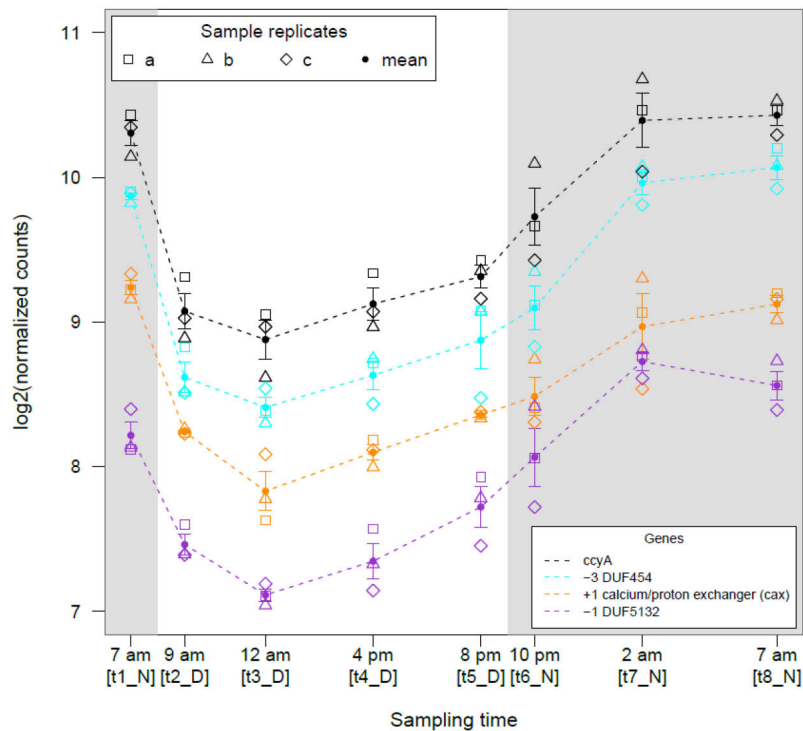


Figure 4.7 Abundance profiles of three genomic neighbors of *ccyA* during the day/night cycle. The CDS located at positions -3, -1, +1 correspond to the *ccyA* neighbors with transcript abundance profiles the most correlated to *ccyA* transcript abundance profile (Pearson correlation coefficient of 0.97 (P-value=1.7e-15), 0.95 (P-value=8.0e-13), 0.94 (P-value=1.2e-11), respectively).

Among the 20 neighboring genes of *ccyA*, 8 showed an expression profile correlated with that of *ccyA*. Interestingly, the expression profile of the two adjacent genes of *ccyA*, located on the same DNA strand (see Table IV.IV), displayed a strong positive correlation with the expression profile of *ccyA* (Figure 4.6 and 4.7). The expression profile of the gene located at -3 genes with respect to *ccyA* on the other strand (see Table IV.IV), exhibited one of the strongest correlations with the expression profile of *ccyA* (Figure 4.6), with a nearly identical expression profile (Figure 4.7). This gene is annotated as a DUF454 family protein. Finally, the expression profiles of two other genes, located at +10 and +5 genes with respect to *ccyA* showed a weaker but significant positive correlation with the expression profile of *ccyA*. The gene at +10 was annotated as a glycosyltransferase family 4 protein, but no functional annotation was retrieved for the gene at +5 (see Table IV.IV).

Table IV.IV. *ccyA* gene neighborhood in *M. aeruginosa* PCC 7806SL complete genome assembly. General features and annotations are listed for the 10 CDS located upstream (-10 to -1) and the 10 CDS located downstream (+1 to +10) to the position of *ccyA*. RefSeq annotations correspond to the assembly accession *GCF_002095975.1* (*NZ_CP020771.1*).

Protein accession (NCBI RefSeq)	CDS position		Strand	Start (nt)	End (nt)	Gene name	Protein functional annotation (NCBI RefSeq)	COG (DeepNOG annotation)		
	NCBI RefSeq	relative to <i>ccyA</i>						Accession	Confidence	Category
WP_002741645.1	4262	-10	+	4515650	4516447	rpsB	30S ribosomal protein S2	COG0052	1.0	J
WP_002741643.1	4263	-9	+	4516564	4517319	tsf	translation elongation factor Ts	COG0264	1.0	J
WP_002741642.1	4264	-8	+	4517577	4519484	shc	squalene--hopene cyclase	COG1657	1.0	I
WP_051048450.1	4265	-7	-	4519545	4519886		transcriptional regulator	COG5499	0.99	V
pseudo (partial=3')	4266	-6	+	4520389	>4520916		ISL3 family transposase			
pseudo (partial=3')	4267	-5	-	<4520947	4521127		IS1 family transposase			
WP_002753396.1	4268	-4	-	4521343	4521633		DUF5132 domain-containing protein	COG4980	0.99	R
WP_036399769.1	4269	-3	+	4521771	4522358		DUF454 family protein	COG2205	0.28	T
WP_228036328.1	4270	-2	+	4522489	4522689		hypothetical protein	COG2161	0.20	V
WP_002741624.1	4271	-1	+	4522868	4523182		DUF5132 domain-containing protein	COG1826	0.96	U
WP_084990073.1	4272	0	+	4523229	4524278		cell envelope biogenesis protein OmpA	COG3134	0.95	S
WP_084990074.1	4273	+1	+	4524268	4525377	cax	calcium/proton exchanger	COG0387	1.0	P
WP_084990075.1	4274	+2	-	4525733	4527469		IS1634 family transposase	COG5421	0.99	X
WP_002734319.1	4275	+3	-	4527740	4527985	psaC	photosystem I iron-sulfur center protein PsaC	COG5703	1.0	C
WP_002741619.1	4276	+4	+	4528237	4530207	acs	acetate--CoA ligase	COG0365	1.0	I
WP_084990076.1	4277	+5	+	4530562	4531158		hypothetical protein	COG1196	0.40	D
WP_002741615.1	4278	+6	+	4531198	4531722		GNAT family N-acetyltransferase	COG1670	0.99	J,O
WP_002731545.1	4279	+7	-	4531850	4532356		DUF1269 domain-containing protein	COG4803	1.0	S
WP_084990077.1	4280	+8	-	4532613	4533059		DUF1269 domain-containing protein	COG4803	0.99	S
WP_002756663.1	4281	+9	-	4533361	4533978		CBS domain-containing protein	COG5792	1.0	C,T
WP_002741611.1	4282	+10	-	4534069	4535259		glycosyltransferase family 4 protein	COG0438	1.0	M

By contrast, three genes, located at -10, -8, and +4, displayed the inverse expression pattern compared with *ccyA*. Those genes were annotated as (i) a subunit of the 30S ribosomal protein S2, (ii) a squalene-hopene cyclase (a protein involved in the permeability and fluidity of prokaryote membranes (57)), and (iii) an acetate-CoA ligase, *i.e.* a protein of Ca or in CCM were searched in the genome of PCC 7806 (table S3). In total, 23 genes involved in CCM and their homologs and 23 genes involved in Ca²⁺ transport and their homologs involved in the metabolism of acetate (58), respectively.

Last, genes encoding for proteins possibly involved in the passive and active transport were found in the genome of PCC 7806SL. The expression profiles of 7 out of the 23 genes involved in CCM were correlated negatively with the expression profile of *ccyA* (in magenta, yellow subset in Figure 4.6), whereas the expression profiles of 5 of CCM genes positively correlated with the expression profile of *ccyA* (in magenta, grey subset in Figure 4.6). Among the 23 genes involved in Ca²⁺ transport, the expression profiles of 5 of them were correlated negatively with *ccyA* expression profile (in cyan, yellow subset in Figure 4.6), while the expression profile of 10 of them positively correlated with *ccyA* (in cyan, grey subset in Fig5).

4 Discussion

The identification of a marker gene of iACC biomineralisation in cyanobacteria (18) was a first step towards understanding the molecular mechanisms controlling the formation of these inclusions. However, until now, only the presence/absence of the gene (18,42), or its structure (18) have been investigated. Here, we explored whether this marker gene is indeed transcribed in an organism capable of forming iACC.

Usually, several tools are available for assessing the transcription of a large number of genes within a genome, including DNA microarray or high-throughput RNA sequencing (RNAseq) (59). Microarrays are limited by the use of probes: the number of studied genes remains limited by the available knowledge of the genome of the targeted organism. By contrast, RNAseq allows targeting all the mRNAs in a cell and has the advantage of giving the state of transcriptional activity of the organisms (60). The other major difference is that RNAseq can achieve higher resolution (*i.e.* higher accuracy in the gene expression) than microarrays. Because this technique does not suffer microarray-based limitations such as background noise and saturation, it can also achieve a lower detection limit, and thus detect genes with very low expression (61). Straub *et al.* (2011) (15) already studied the expression of the overall genome of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 over a 24-h day/night cycle, using DNA microarray. Using their publicly available dataset, we determined that the *ccyA* gene was present (MIC_2500) but with an expression level that was not significantly different from the background noise. Here, the RNA-seq technique enabled the detection and analysis of the *ccyA* gene expression dynamics. The expression level of *ccyA* in our dataset was above the average expression level of all genes for at least some of the time points, we can thus conclude that the *ccyA* gene is clearly expressed in an iACC-forming strain.

In line with the previous study on the dynamics of gene expression in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (15), we found that the day/night cycle is an important factor driving variations in global gene expression of PCC7806. Cyanobacteria have a highly defined circadian clock, and this day/night gene expression pattern has been demonstrated in many other studied strains (49,50,62). Straub *et al.* (2011) (15) showed that the metabolism of *M. aeruginosa* undergoes compartmentalization between the light and dark periods. Specifically, during the light period, processes including carbon uptake, photosynthesis, and the reductive pentose phosphate pathway result in glycogen synthesis. Conversely, in the dark period, glycogen degradation, the oxidative pentose phosphate pathway, the TCA branched pathway, and ammonium uptake promote amino acid biosynthesis. Furthermore, the biosynthesis of secondary metabolites, such as microcystins, aeruginosin, and cyanopeptolin, predominantly occurs during the light period.

A clear day-night expression pattern was observed for the *ccyA* gene: the expression was significantly higher than the average genome expression from the middle of the night (2 am, t7_N) to the end of the night (7 am, t8_N). In all other time points of the 24-h cycle, the expression level of this gene did not differ from the average expression of all genes. The gene is therefore transcribed from the middle of the night to the end of the night. While mRNA abundance provides valuable information about gene expression, it does not always directly correlate with the protein levels in the cell (63–65). Several factors, including translation, initiation and elongation rate (65), post-translational modifications, protein stability, and degradation rates (66,67) may impact the relationship between mRNA abundance and protein content. As such, it is difficult to infer the abundance of calcyanin from the transcript expression level only. One can speculate that the protein could be accumulated at a cell location that remains unknown during the second part of the night, and function during the day. In the future, direct measurements of the protein abundance should be performed using proteomics in order to quantify the calcyanin content in cells.

Interestingly, we were able to show that a $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter (*cax* gene) and a DUF-containing protein were not only directly co-localized upstream and downstream of *ccyA*, on the same DNA strand but they were also co-expressed with *ccyA*. This suggests that those three genes could be part of a functioning unit of DNA that could be transcribed together into a single mRNA strand, *i.e.* an operon. The combined presence of homologs of a $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter gene and the Na^+ -dependent bicarbonate *bicA* was shown to be significantly associated with *ccyA* in the Cyanobacteria phylum (18). For certain strains (*C. fritschii* PCC 9212, PCC 6912 and *Fischerella* sp. NIES-4106), the *ccyA* gene was co-localized with this transporter, mirroring the situation observed in *M. aeruginosa* PCC 7806. The co-expression of *ccyA* with these genes in *M. aeruginosa* PCC 7806 further reinforces the hypothesis that all three genes may play a concerted role in iACC formation. The process of intracellular amorphous calcium carbonate formation necessitates the accumulation of calcium and bicarbonate ions at concentrations higher than the cytosolic concentrations typically measured in cells (68). Therefore, it may be suggested that the *bicA* and *cax* genes are

involved in the build-up of these accumulations. However, the functioning of CAX proteins opens some question. Indeed, the only $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchanger found in *Synechocystis* PCC 6803 has been shown to be located in the plasma membrane and catalyzing Ca^{2+} efflux out of the cells (69). By contrast, it has been suggested that CAX proteins in plants may have different locations and efflux Ca^{2+} from the cytoplasm either to the extracellular space or to intracellular vacuoles (70). Locating these transporters within *M. aeruginosa* PCC 7806 cells would therefore be crucial to better understand their potential involvement in iACC formation.

Moreover, building upon the approach followed by De Wever *et al.* (2019) (1), we conducted a comprehensive search for annotated genes involved in CCM and calcium transport, as well as their homologous counterparts. Firstly, a greater number of genes associated with CCM or their homologs appeared to be expressed preferentially during the day instead of at night, compared with genes associated with Ca^{2+} transport. Similarly, Straub *et al.* (2011) (15) showed that the transcript abundance of CCM genes showed a peak in expression just after the night/day transition and then a rapid decrease after the day/night transition. The elevated concentration of CO_2 in carboxysomes resulting from the CCM is a way to improve photosynthesis performance (71). The expression of CCM genes during the day is therefore expected.

Among the 23 genes identified as involved or potentially involved in CCM, only 5 had an expression pattern positively correlated with that of *ccyA*. One may speculate that the inorganic carbon reservoir utilized by photosynthesis is separated from a potential reservoir involved in iACC biomineralization. The co-expression of these 5 genes with *ccyA* suggests their potential candidacy as bicarbonate transporters specifically associated with iACC biomineralization. Notably, two of these genes *CmpC* and *CmpD* are two subunits of the inorganic carbon transporter BCT1 involved in the cyanobacterial CCM (Price & Howitt 2011). BCT1 is a high-affinity but low-flux HCO_3^- transporter. It is composed of 4 subunits, and among them, *CmpC* and *CmpD* are extrinsic cytoplasmic proteins that possess binding sites for ATP (71).

In another study about the gene expression of *M. aeruginosa* PCC 7806 (by microarray) by Sandrini *et al.* (2015) (72), notable changes were observed in the uptake of inorganic carbon. Under low pCO_2 conditions, cells predominantly relied on bicarbonate uptake, while under high pCO_2 conditions, the expression of bicarbonate uptake systems (notably *cmpA*, *B*, and *C* gene) was down-regulated, and cells shifted towards CO_2 and low-affinity bicarbonate uptake. These findings indicate that the necessity for high-affinity bicarbonate uptake systems diminishes in the presence of elevated CO_2 levels. In this study, pCO_2 was not regulated nor monitored, and the change of expression in CCM-involved genes such as *cmpD* and *C* could be due to changes in pCO_2 conditions during day/night transitions. In future studies exploring the molecular controls of biomineralization, a special focus on these parameters would be appropriate.

In contrast to the bicarbonate transporters and their homologs, the number of genes potentially linked to Ca transport and with an expression profile positively correlated with that of *ccyA* (10 genes) was higher than genes with an expression profile negatively correlated with *ccyA* (5 genes). The transport of Ca ions into the cytosol is commonly considered a passive process facilitated by channels that exhibit low ionic specificity (73). Here, only 1 of the 9 genes correlated with *ccyA* was identified as a passive transporter (hB1-1). The 8 other genes include the *cax* gene neighboring *ccyA*, two *apnhaP* genes (Na⁺/H⁺ antiporter) and three of their homologs, a UPF0016 gene (putative Ca²⁺/H⁺ transporter) and a Ca²⁺ATPase and one of their homologs.

Although some of these 46 genes associated with bicarbonate or Ca transport are well characterized, other genes identified by homology have not been characterized at all. Their substrates have therefore not been identified, and their role in calcium or bicarbonate homeostasis only remains putative. In a comparative genomics approach performed at the scale of the whole Cyanobacteria phylum, *ccyA* was the only gene identified as shared by iACC+ strains and absent in ACC- strains. However, some genes present in both iACC - and iACC + strains could also be involved in iACC formation, in a case of recruitment of genes for a new function (here iACC formation). Moreover, there could also be genes involved in iACC formation specific to *Microcystis*. The present study is a step towards identifying possible partners in iACC formation, but only studies specifically targeting these genes will be able to provide definitive answers about their implications in the iACC formation process. Furthermore, investigations into the comprehensive response of *Microcystis* to fluctuations in Ca and/or pCO₂ levels could provide valuable insights into the molecular mechanisms underlying the biomineralization of iACC. These studies should encompass monitoring of the physicochemical parameters of the environment and the quantification of iACC formation. Notably, certain semi-quantitative techniques, such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) (74) and X-ray absorption near edge structure (XANES) spectroscopy (75), offer the capability to detect cyanobacterial iACC and assess their relative abundance.

5 Bibliographie du Chapitre 4

1. Wever AD, Benzerara K, Coutaud M, Caumes G, Poinot M, Skouri-Panet F, . Evidence of high Ca uptake by cyanobacteria forming intracellular CaCO₃ and impact on their growth. *Geobiology*. 2019;17(6):676–90.
2. Harke MJ, Steffen MM, Gobler CJ, Otten TG, Wilhelm SW, Wood SA, et al. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae*. 2016;54:4–20.
3. Dick GJ, Duhaime MB, Evans JT, Errera RM, Godwin CM, Kharbush JJ, et al. The genetic and ecophysiological diversity of *Microcystis*. *Environ Microbiol*. 2021;1462-2920.15615.
4. Wilson AE, Sarnelle O, Neilan BA, Salmon TP, Gehring MM, Hay ME. Genetic Variation of the Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among Lakes: Implications for Harmful Algal Blooms. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(10):6126–33.
5. Chen Z, Zhang J, Li R, Tian F, Shen Y, Xie X, et al. Metatranscriptomics analysis of cyanobacterial aggregates during cyanobacterial bloom period in Lake Taihu, China. *Environ Sci Pollut Res*. 2018;25(5):4811–25.
6. Davenport EJ, Neudeck MJ, Matson PG, Bullerjahn GS, Davis TW, Wilhelm SW, et al. Metatranscriptomic Analyses of Diel Metabolic Functions During a *Microcystis* Bloom in Western Lake Erie (United States). *Front Microbiol*. 2019;10:2081.

7. Claire P. Nouvelles perspectives sur les produits naturels de cyanobactéries d'eau douce et leurs clusters de gènes, apportées par l'intégration de données à haut débit. [Paris]: Sorbonne Université; 2017.
8. Harke MJ, Davis TW, Watson SB, Gobler CJ. Nutrient-Controlled Niche Differentiation of Western Lake Erie Cyanobacterial Populations Revealed via Metatranscriptomic Surveys. *Environ Sci Technol.* 2016;50(2):604–15.
9. Harke MJ, Jankowiak JG, Morrell BK, Gobler CJ. Transcriptomic Responses in the Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis* Induced during Exposure to Zooplankton. *Applied and Environmental Microbiology.* 2017;83(5):e02832-16.
10. Harke MJ, Gobler CJ. Global Transcriptional Responses of the Toxic Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to Nitrogen Stress, Phosphorus Stress, and Growth on Organic Matter. Campbell DA, editor. *PLoS ONE.* 2013;8(7):e69834.
11. Harke MJ, Gobler CJ. Daily transcriptome changes reveal the role of nitrogen in controlling microcystin synthesis and nutrient transport in the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *BMC Genomics.* 2015;16(1):1068.
12. Morimoto D, Kimura S, Sako Y, Yoshida T. Transcriptome Analysis of a Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* during Ma-LMM01 Phage Infection. *Front Microbiol.* 2018;9:2.
13. Pascault N, Rué O, Loux V, Pédrón J, Martin V, Tambosco J, et al. Insights into the cyanosphere: capturing the respective metabolisms of cyanobacteria and chemotrophic bacteria in natural conditions? *Environmental Microbiology Reports.* 2021;13(3):364–74.
14. Penn K, Wang J, Fernando SC, Thompson JR. Secondary metabolite gene expression and interplay of bacterial functions in a tropical freshwater cyanobacterial bloom. *ISME J.* 2014;8(9):1866–78.
15. Straub C, Quillardet P, Vergalli J, de Marsac NT, Humbert JF. A Day in the Life of *Microcystis aeruginosa* Strain PCC 7806 as Revealed by a Transcriptomic Analysis. Schönbach C, editor. *PLoS ONE.* 2011;6(1):e16208.
16. Steffen MM, Dearth SP, Dill BD, Li Z, Larsen KM, Campagna SR, et al. Nutrients drive transcriptional changes that maintain metabolic homeostasis but alter genome architecture in *Microcystis*. *ISME J.* 2014;8(10):2080–92.
17. Mehta N, Benzerara K, Kocar BD, Chapon V. Sequestration of Radionuclides Radium-226 and Strontium-90 by Cyanobacteria Forming Intracellular Calcium Carbonates. *Environ Sci Technol.* 2019;53(21):12639–47.
18. Benzerara K, Duprat E, Bitard-Feildel T, Caumes G, Cassier-Chauvat C, Chauvat F, et al. A New Gene Family Diagnostic for Intracellular Biomineralization of Amorphous Ca Carbonates by Cyanobacteria. Dagan T, editor. *Genome Biology and Evolution.* 2022;14(3):evac026.
19. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods.* 2017;14(4):417–9.
20. Everaert C, Luybaert M, Maag JLV, Cheng QX, Dinger ME, Hellemans J, et al. Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. *Sci Rep.* 2017;7(1):1559.
21. Lambert I, Paysant-Le Roux C, Colella S, Martin-Magniette ML. DiCoExpress: a tool to process multifactorial RNAseq experiments from quality controls to co-expression analysis through differential analysis based on contrasts inside GLM models. *Plant Methods.* 2020;16(1):68.
22. Boskey AL. Biomineralization: An Overview. *Connective Tissue Research.* 2003;44(1):5–9.
23. Knoll AH. Biomineralization and Evolutionary History. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry.* 2003;54(1):329–56.
24. Brownlee C, Wheeler GL, Taylor AR. Coccolithophore biomineralization: New questions, new answers. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2015;46:11–6.
25. Monteiro FM, Bach LT, Brownlee C, Bown P, Rickaby REM, Poulton AJ, et al. Why marine phytoplankton calcify. *Science Advances.* 2016;2(7):e1501822.
26. Cosmidis J, Benzerara K. Why do microbes make minerals? *Comptes Rendus Géoscience.* 2022;354(G1):1–39.
27. Görden S, Benzerara K, Skouri-Panet F, Gugger M, Chauvat F, Cassier-Chauvat C. The diversity of molecular mechanisms of carbonate biomineralization by bacteria. *Discov Mater.* 2021;1(1):2.
28. Gilbert PUPA, Bergmann KD, Boekelheide N, Tambutté S, Mass T, Marin F, et al. Biomineralization: Integrating mechanism and evolutionary history. *Science Advances.* 2022;8(10):eabl9653.
29. Marin F, Luquet G. Molluscan shell proteins. *Comptes Rendus Palevol.* 2004;3(6):469–92.
30. Le Roy N, Jackson DJ, Marie B, Ramos-Silva P, Marin F. The evolution of metazoan α -carbonic anhydrases and their roles in calcium carbonate biomineralization. *Frontiers in Zoology.* 2014;11(1):75.
31. Chen S, Gagnon AC, Adkins JF. Carbonic anhydrase, coral calcification and a new model of stable isotope vital effects. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 2018;236:179–97.

32. Mackinder L, Wheeler G, Schroeder D, von Dassow P, Riebesell U, Brownlee C. Expression of biomineralization-related ion transport genes in *Emiliana huxleyi*. *Environ Microbiol*. 2011;13(12):3250–65.
33. Marin F, Smith M, Isa Y, Muyzer G, Westbroek P. Skeletal matrices, mucins, and the origin of invertebrate calcification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(4):1554–9.
34. Marin F, Corstjens P, Gaulejac B de, Jong E de VD, Westbroek P. Mucins and Molluscan Calcification: Molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna Nobilis* (Bivalvia, Pteriomorpha). *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(27):20667–75.
35. Monteil CL, Perrière G, Menguy N, Ginet N, Alonso B, Waisbord N, et al. Genomic study of a novel magnetotactic Alphaproteobacteria uncovers the multiple ancestry of magnetotaxis. *Environ Microbiol*. 2018;20(12):4415–30.
36. Uebe R, Schüller D. Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(10):621–37.
37. Taoka A, Eguchi Y, Shimoshige R, Fukumori Y. Recent advances in studies on magnetosome-associated proteins composing the bacterial geomagnetic sensor organelle. *Microbiology and Immunology*. 2023;67(5):228–38.
38. Liu P, Zheng Y, Zhang R, Bai J, Zhu K, Benzerara K, et al. Key gene networks that control magnetosome biomineralization in magnetotactic bacteria. *National Science Review*. 2023;10(1):nwac238.
39. Altermann W, Kazmierczak J, Oren A, Wright DT. Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history. *Geobiology*. 2006;4(3):147–66.
40. Couradeau E, Benzerara K, Gérard E, Moreira D, Bernard S, Brown GE, et al. An Early-Branching Microbialite Cyanobacterium Forms Intracellular Carbonates. *Science*. 2012;336(6080):459–62.
41. Benzerara K, Skouri-Panet F, Li J, Ferard C, Gugger M, Laurent T, et al. Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(30):10933–8.
42. Gaëtan J, Halary S, Millet M, Bernard C, Duval C, Hamlaoui S, et al. Widespread formation of intracellular calcium carbonates by the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis*. *Environ Microbiol*. 2022;
43. Cam N, Benzerara K, Georgelin T, Jaber M, Lambert JF, Poinot M, et al. Cyanobacterial formation of intracellular Ca-carbonates in undersaturated solutions. *Geobiology*. 2018;16(1):49–61.
44. Benzerara K, Görgen S, Khan Monis A, Chauvat F, March K, Menguy N, et al. Quantitative mapping of calcium cell reservoirs in cyanobacteria at the submicrometer scale. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*. 2023;267:147369.
45. Li J, Margaret Oliver I, Cam N, Boudier T, Blondeau M, Leroy E, et al. Biomineralization Patterns of Intracellular Carbonatogenesis in Cyanobacteria: Molecular Hypotheses. *Minerals*. 2016;6(1):10.
46. Blondeau M, Sachse M, Boulogne C, Gillet C, Guigner JM, Skouri-Panet F, et al. Amorphous Calcium Carbonate Granules Form Within an Intracellular Compartment in Calcifying Cyanobacteria. *Front Microbiol*. 2018;9:1768.
47. Badger MR, Price GD. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*. 2003;54(383):609–22.
48. Welkie DG, Rubin BE, Diamond S, Hood RD, Savage DF, Golden SS. A Hard Day's Night: Cyanobacteria in Diel Cycles. *Trends in Microbiology*. 2019;27(3):231–42.
49. Stöckel J, Welsh EA, Liberton M, Kunnvakkam R, Aurora R, Pakrasi HB. Global transcriptomic analysis of Cyanotheca 51142 reveals robust diurnal oscillation of central metabolic processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(16):6156–61.
50. Zinser ER, Lindell D, Johnson ZI, Futschik ME, Steglich C, Coleman ML, et al. Choreography of the Transcriptome, Photophysiology, and Cell Cycle of a Minimal Photoautotroph, *Prochlorococcus*. Rodriguez-Valera F, editor. *PLoS ONE*. 2009;4(4):e5135.
51. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*. 1979;111(1):1–61.
52. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*. 2010;11(3):R25.
53. Feldbauer R, Gosch L, Lüftinger L, Hyden P, Flexer A, Rattei T. DeepNOG: fast and accurate protein orthologous group assignment. *Bioinformatics*. 2021;36(22–23):5304–12.
54. Cumsille A, Durán RE, Rodríguez-Delherbe A, Saona-Urmeneta V, Cámara B, Seeger M, et al. GenoVi, an open-source automated circular genome visualizer for bacteria and archaea. *PLOS Computational Biology*. 2023;19(4):e1010998.

55. Hirschi KD, Zhen RG, Cunningham KW, Rea PA, Fink GR. CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93(16):8782–6.
56. Waight AB, Pedersen BP, Schlessinger A, Bonomi M, Chau BH, Roe-Zurz Z, et al. Structural basis for alternating access of a eukaryotic calcium/proton exchanger. Nature. 2013;499(7456):107–10.
57. Wendt KU, Lenhart A, Schulz GE. The structure of the membrane protein squalene-hopene cyclase at 2.0 Å resolution 11 Edited by D. C. Rees. Journal of Molecular Biology. 1999;286(1):175–87.
58. Brown TDK, Jones-Mortimer MC, Kornberg HL. The Enzymic Interconversion of Acetate and Acetyl-coenzyme A in Escherichia coli. Microbiology. 1977;102(2):327–36.
59. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet. 2009;10(1):57–63.
60. Mantione KJ, Kream RM, Kuzelova H, Ptacek R, Raboch J, Samuel JM, et al. Comparing Bioinformatic Gene Expression Profiling Methods: Microarray and RNA-Seq. Med Sci Monit Basic Res. 2014;20:138–41.
61. Zhao S, Fung-Leung WP, Bittner A, Ngo K, Liu X. Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells. PLoS One. 2014;9(1):e78644.
62. Pattanayak G, Rust MJ. The cyanobacterial clock and metabolism. Current Opinion in Microbiology. 2014;18:90–5.
63. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. Nature. 2011;473(7347):337–42.
64. Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JRS, Weissman JS. Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. Science. 2009;324(5924):218–23.
65. Riba A, Di Nanni N, Mittal N, Arhné E, Schmidt A, Zavolan M. Protein synthesis rates and ribosome occupancies reveal determinants of translation elongation rates. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019;116(30):15023–32.
66. Gancedo JM, López S, Ballesteros F. Calculation of half-lives of proteins in vivo. Heterogeneity in the rate of degradation of yeast proteins. Mol Cell Biochem. 1982;43(2):89–95.
67. Christiano R, Nagaraj N, Fröhlich F, Walther TC. Global Proteome Turnover Analyses of the Yeasts *S. cerevisiae* and *S. pombe*. Cell Reports. 2014;9(5):1959–65.
68. Cam N, Georgelin T, Jaber M, Lambert JF, Benzerara K. In vitro synthesis of amorphous Mg-, Ca-, Sr- and Ba-carbonates: What do we learn about intracellular calcification by cyanobacteria? Geochimica et Cosmochimica Acta. 2015;161:36–49.
69. Waditee R, Hossain GS, Tanaka Y, Nakamura T, Shikata M, Takano J, et al. Isolation and Functional Characterization of Ca²⁺/H⁺ Antiporters from Cyanobacteria *. Journal of Biological Chemistry. 2004;279(6):4330–8.
70. Shigaki T, Rees I, Nakhleh L, Hirschi KD. Identification of Three Distinct Phylogenetic Groups of CAX Cation/Proton Antiporters. J Mol Evol. 2006;63(6):815–25.
71. Price GD, Howitt SM. The cyanobacterial bicarbonate transporter BicA: its physiological role and the implications of structural similarities with human SLC26 transporters. Biochem Cell Biol. 2011;89(2):178–88.
72. 1. Sandrini G, Cunsolo S, Schuurmans JM, Matthijs HCP, Huisman J. Changes in gene expression, cell physiology and toxicity of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* at elevated CO₂. Frontiers in Microbiology. 2015;6:1. 73. Domínguez DC, Guragain M, Patrauchan M. Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. Cell Calcium. 2015;57(3):151–65.
74. Mehta N, Gaëtan J, Giura P, Azaïs T, Benzerara K. Detection of biogenic amorphous calcium carbonate (ACC) formed by bacteria using FTIR spectroscopy. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2022;121262.
75. Mehta N, Vantelon D, Gaëtan J, Fernandez-Martinez A, Benzerara K. Calcium speciation and coordination environment in intracellular amorphous calcium carbonate (ACC) formed by cyanobacteria. Chemical Geology. in rev.;

Chapitre 5 Conclusions et perspectives

1 La biominéralisation d'iACC chez *Microcystis*

1.1 Un phénomène répandu au sein des espèces de *Microcystis*?

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier la capacité de biominéralisation d'iACC par le genre cyanobactérien *Microcystis*. Pour cela, des approches multidisciplinaires ont été utilisées pour étudier *in situ* la formation d'iACC et *in silico* pour identifier les éventuels mécanismes moléculaires qui contrôlent la biominéralisation. Avant ces travaux de thèse, 12 souches de *Microcystis* étaient caractérisées comme ayant le gène marqueur *ccyA* dans leur génomes, 10 d'entre elles formant également des iACC. Une des toutes premières questions était de savoir si *Microcystis* formait des iACC dans des conditions environnementales ?

Nous avons observé la présence de cellules de *Microcystis* formant des iACC dans cinq lacs régulièrement soumis à des blooms de *Microcystis* (France et Espagne), ce qui montre que la formation d'iACC est un phénomène répandu. De plus, une certaine diversité a été observée : au sein d'une même efflorescence, on retrouve des cellules iACC+ et des cellules iACC-. Cette diversité au sein d'une même population a été étudiée plus en détail dans 25 souches de *Microcystis* disponibles dans la collection du MNHN, isolées pour la plupart au cours du même événement d'efflorescence dans le lac de Champs-Sur-Marne (France). Dans cette population, 10 souches possédaient le gène marqueur *ccyA* et formaient des iACC, les 15 autres ne possédaient pas le gène et ne formaient pas d'iACC.

En parallèle, le gène *ccyA* a également été recherché dans 256 génomes complets de haute qualité affiliés à *Microcystis*, extraits des bases de données génomiques GenBank et NCBI. Environ 1/3 (93) de ces génomes contenaient le gène *ccyA*. Les génotypes contenant le gène *ccyA* étaient largement distribués dans l'arbre phylogénétique et ont été récupérés dans de multiples lieux géographiques, couvrant 12 pays différents sur cinq continents (Asie, Europe, Afrique et Amérique du Nord et du Sud). Parmi tous les génomes disponibles, nous avons regroupé des souches isolées du même événement d'efflorescence (c'est-à-dire du même plan d'eau et isolées au même moment ou en l'espace de quelques mois). Certaines populations étaient composées uniquement de génomes contenant le gène *ccyA*, d'autres uniquement de génomes sans *ccyA*, les autres variant entre ces deux extrêmes. Comme le suggère notre observation sur des échantillons naturels, il semble que des *Microcystis ccyA+* et *ccyA-* puissent coexister au sein d'un bloom.

Cette étude a permis de mettre en évidence que la formation d'iACC par *Microcystis* est un phénomène commun et répandu. De plus, elle permet de confirmer la corrélation forte qui existe entre la présence du gène *ccyA* et la formation d'iACC, ce qui renforce l'idée qu'on puisse prédire la capacité de biominéralisation d'iACC sur la base de la présence ce gène. Enfin, la distribution quasi-binaire de ce gène dans des populations issues d'environnements distincts suggère qu'il pourrait exister des paramètres environnementaux qui favorisent certains types de génotypes (*ccyA+* ou *ccyA-*).

1.2 Un phénomène quantifiables à l'échelle de populations naturelles ?

Le second objectif de cette thèse était d'évaluer l'abondance des cellules iACC+ au sein des populations de *Microcystis* et les quantités de Ca associées, en comparaison avec la quantité de Ca présente sous d'autres formes chimiques dans deux lacs d'Ile de France.

L'étude temporelle de deux sites d'Ile-de-France a permis de mettre en évidence la présence de cellules de *Microcystis* formant des iACC sur quasiment toute la période étudiée. De manière cohérente, le suivi du gène marqueur a lui mis en évidence une population *ccyA+* toujours présente. Dans ces lacs, lorsque la biomasse de *Microcystis* était relativement faible (de 10^2 à 10^4 copies ARNr16S.mL⁻¹), la proportion de souches *ccyA+* dans la population entière pouvait atteindre jusqu'à 70 % de la population totale de *Microcystis*, mais cette estimation comporte des incertitudes assez importantes, d'environ 30 %. Lorsque la population de *Microcystis* se développait, la majorité de la biomasse est constituée de cellules qui ne possèdent pas le gène *ccyA*, et ne forment pas d'iACC. Cependant, entre le 06 et le 13/10 le site de Verneuil, la population *ccyA+* /population entière atteint 50% d'une population de *Microcystis* relativement importante pour la saison ($7 \pm 0,6 \times 10^4$ copies ARNr16S.mL⁻¹). Cette date montre cependant que la population formant des iACC pourrait éventuellement représenter une part non négligeable des populations de *Microcystis* dans certaines conditions. Tout au long de l'étude, les cellules de *Microcystis* n'ont pas constitué une biomasse importante, telle qu'elle peut être observée dans d'autres environnement lors d'efflorescences (1,2).

Une des questions cruciales de cette thèse était la quantification des iACC dans le réservoir particulaire total de calcium dans les lacs de Cergy et Verneuil. Si la présence des iACC a bien été détectée, les iACC ne constituaient pas un compartiment assez important pour être détecté par nos techniques (FTIR, XANES). De façon générale, la biomasse de *Microcystis* est restée faible sur toute la période d'échantillonnage. Il est difficile de prévoir le moment et l'intensité des efflorescences, ce qui complique l'établissement d'un plan d'échantillonnage. De ce fait, la question de savoir s'il existe une biomasse minimale nécessaire ou si la dominance de *Microcystis* au sein du phytoplancton favorise l'émergence des populations *ccyA+* demeure sans réponse. Une approche systématique des efflorescences dans différents écosystèmes serait donc intéressante pour mieux comprendre cette relation.

Dans ces travaux, nous n'avons pas détecté l'expression du gène *ccyA* dans les lacs de Cergy et de Verneuil. Des biomasses de *Microcystis* faibles ainsi qu'une proportion faible dans le phytoplancton peuvent expliquer que parmi le stock total des ARN extraient de nos échantillons, ceux appartenant au transcriptome de *Microcystis* ne constituent pas une part importante. De plus, nous venons de que si le gène *ccyA* était bien exprimé, mais à des niveaux d'expression faibles par rapport à d'autres gènes constitutifs (tel que l'ARNr 16S). Ainsi, si le gène *ccyA* était exprimé lors de nos échantillonnage, il devait l'être dans des niveaux en deçà des limites de détections par RT-qPCR. L'expression du gène selon un cycle jour/nuit chez PC7806, avec un maximum d'expression en fin nuit, suggère qu'il faudrait

repenser la stratégie d'échantillonnage : un suivi temporelle sur des cycles de 24-h pourrait éventuellement mettre en évidence un pattern similaire.

1.3 Un mécanisme identifiable à l'échelle d'une souche ?

A ce jour, les seules expériences publiées ciblant l'implication de ce gène dans la biominéralisation sont des expériences de surexpression du gène chez des souches *ccyA*⁻ (3,4). Celles-ci ont montré qu'une surexpression du gène mènent à l'accumulation de calcium plus importante dans les polyphosphates chez les souches transformées avec les plasmides contenant *ccyA* que chez celles contenant le plasmide vide. Si le gène *ccyA* semble donc avoir un rôle dans l'homéostasie du calcium, aucune étude sur son expression n'avait été abordée.

En premier lieu, nous avons mis en évidence l'expression du gène chez une souche de culture : PCC 7806. De plus, on peut observer une expression du gène *ccyA* significativement plus faible le jour que la nuit, avec un pic d'expression en fin de nuit. Le profil d'expression de ce gène a pu être corrélé avec celui de plusieurs voisins génomiques, dont un anti porteur $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ et deux protéines annotées comme DUF (Domain of Unknown Fonction), DUF454 et DUF5132. Ces gènes semblent donc faire partie d'une cassette d'expression, et sont flanqués d'éléments de mobilité en 5' et de transposase en 3'. Ces résultats viennent appuyer l'observation précédemment faite de la présence d'homologues de cet anti-porteur $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ au voisinage de *ccyA* chez d'autres souches de cyanobactéries (*C. fritschii* PCC 9212, PCC 6912 et *Fischerella* sp. NIES-4106 (4)). La corrélation de l'expression du gène avec des gènes impliqués ou potentiellement impliqués dans le transport du Ca et du C permet de proposer de potentiels partenaires dans le processus de biominéralisation. Il serait nécessaire d'étendre cette étude à d'autres souches de *Microcystis* pour vérifier si cette synténie est partagée entre toutes les souches *ccyA*⁺. Enfin, il faudrait repenser des expériences de culture pour étudier spécifiquement la biominéralisation, en contrôlant la pCO_2 et en testant différentes concentrations en calcium dissous par exemple.

2 Apport méthodologique à l'étude des iACC chez les cyanobactéries

Ce travail a permis de dresser un premier portrait de la biominéralisation d'iACC chez *Microcystis*. Pour un genre abondamment étudié (5–8) dont les efflorescences ont de nombreuses répercussions socio-économiques et environnementales (9–11), il est intéressant de constater que la découverte de la formation d'iACC est récente (4). De nombreuses raisons ont déjà été données dans d'autres études portant sur les iACC chez les cyanobactéries (4,12). Une des façons de caractériser la présence d'iACC, et de les distinguer d'autres types d'inclusion tel que les polyP, est l'utilisation de la microscopie électronique couplée à de l'EDXS (13–15). Ces techniques sont cependant chronophages, et ne permettent de regarder que quelques dizaines de cellules par échantillon. Lors de ma thèse, j'ai participé au développement de protocole d'utilisation de deux techniques spectrales pour la détection et la quantification des iACC biogéniques.

2.1 Détection des ACC chez les cyanobactéries par FTIR (Mehta *et al.* 2022) (16)

Nous avons développé une méthode de criblage rapide, permettant de déterminer la présence ou l'absence d'iACC au sein d'une culture ou d'un échantillon naturel, en collaboration avec Neha Mehta (IMPMC). Pour cela nous avons choisi d'utiliser la spectrométrie infrarouge (FTIR) en réflexion totale atténuée (ATR). La spectroscopie FTIR permet de distinguer les phases amorphes ou cristallines de carbonates de calcium (17). Deux vibrations FTIR caractéristiques de l'ACC, à $\approx 860 \text{ cm}^{-1}$ et $\approx 306 \text{ cm}^{-1}$, ont été identifiées comme des sondes spectrales fiables pour détecter rapidement les ACC d'origine procaryote. En utilisant ces sondes spectrales, nous avons testé plusieurs souches de *Microcystis*. Nous avons identifié quatre des huit souches de *Microcystis* possédant la capacité de former des ACC et avons confirmé ces résultats par des observations SEM. Nous avons également montré que cette technique peut-être semi-quantitative de la teneur en ACC des souches de *Microcystis*. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que le FTIR peut faciliter la détection rapide des souches formant des iACC.

2.2 Spéciation et coordinence du calcium dans les iACC chez les cyanobactéries (Mehta et al. in rev) (18)

Les iACC, peu stable, sont facilement perdus lors de la préparation des échantillons, ce qui rend leur caractérisation difficile. Par conséquent, l'utilisation de techniques *in situ* est nécessaire pour sonder les ACC à l'intérieur de cellules intactes, à l'échelle atomique. Dans ces travaux, nous appliquons une technique *in situ*, la spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES), et la spectroscopie d'absorption des rayons X étendue (EXAFS) pour étudier la spéciation du calcium (Ca) et l'environnement de coordination dans les cellules intactes de cyanobactéries formant des ACC. Nos résultats montraient que le XANES est efficace pour détecter les ACC dans les cellules. De plus, nous avons estimé qu'entre 37 et 62% du Ca total dans les souches de cyanobactéries formant des iACC était contenu dans les iACC. Le reste du Ca était contenu soit dans une phase unique, soit un mélange de phases amorphes, probablement du Ca complexé par des molécules organiques. En outre, nous avons pu établir que les iACC présentaient un ordre distinct à courte portée similaire à celui de la monohydrocalcite.

3 Conclusion

La fréquence des proliférations de *Microcystis* s'accélère, entraînant la perte de services écosystémiques, des risques pour la santé humaine et la mortalité d'animaux domestiques et d'élevage (5,9,19). Les facteurs qui déterminent la présence de *Microcystis* dans les eaux douces sont complexes, et on fait l'objet de nombreuses études (5,7,8). Elles ont notamment mis en évidence qu'il existe une diversité intra-genre qui influence fortement la toxicité des efflorescences (7,20,21). La façon dont cette diversité sous-tend la distribution environnementale des différentes souches est encore mal caractérisée. Ce travail de thèse

permet d'apporter un élément nouveau à la compréhension globale de l'écologie de ce genre : *Microcystis* est capable de former des iACC, et il existe une diversité vis-à-vis de ce trait. La prise en compte de ce trait dans de futures études permettrait de mieux comprendre quels sont les facteurs physico-chimiques qui régulent les populations iACC+, et quel rôle joue cette biominéralisation dans l'écologie de cette cyanobactérie.

4 Bibliographie Chapitre 5

1. Harke MJ, Berry DL, Ammerman JW, Gobler CJ. Molecular Response of the Bloom-Forming Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to Phosphorus Limitation. *Microb Ecol.* 2012;63(1):188–98.
2. Rinta-Kanto JM, Ouellette AJA, Boyer GL, Twiss MR, Bridgeman TB, Wilhelm SW. Quantification of Toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 Blooms in Western Lake Erie using Quantitative Real-Time PCR. *Environ Sci Technol.* 2005;39(11):4198–205.
3. Benzerara K, Görgen S, Khan Monis A, Chauvat F, March K, Menguy N, et al. Quantitative mapping of calcium cell reservoirs in cyanobacteria at the submicrometer scale. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena.* 2023;267:147369.
4. Benzerara K, Duprat E, Bitard-Feidel T, Caumes G, Cassier-Chauvat C, Chauvat F, et al. A New Gene Family Diagnostic for Intracellular Biomineralization of Amorphous Ca Carbonates by Cyanobacteria. Dagan T, editor. *Genome Biology and Evolution.* 2022;14(3):evac026.
5. Harke MJ, Steffen MM, Gobler CJ, Otten TG, Wilhelm SW, Wood SA, et al. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae.* 2016;54:4–20.
6. Xiao M, Willis A, Burford MA, Li M. Review: a meta-analysis comparing cell-division and cell-adhesion in *Microcystis* colony formation. *Harmful Algae.* 2017;67:85–91.
7. Dick GJ, Duhaime MB, Evans JT, Errera RM, Godwin CM, Kharbush JJ, et al. The genetic and ecophysiological diversity of *Microcystis*. *Environ Microbiol.* 2021;1462-2920.15615.
8. Wilhelm SW, Bullerjahn GS, McKay RML. The Complicated and Confusing Ecology of *Microcystis* Blooms. Moran MA, editor. *mBio.* 2020;11(3):e00529-20.
9. Paerl HW, Huisman J. Blooms like It Hot. *Science.* 2008;320(5872):57–8.
10. Huisman J, Codd GA, Paerl HW, Ibelings BW, Verspagen JMH, Visser PM. Cyanobacterial blooms. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(8):471–83.
11. Rabalais NN, Díaz RJ, Levin LA, Turner RE, Gilbert D, Zhang J. Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. *Biogeosciences.* 2010;7(2):585–619.
12. Görgen S, Benzerara K, Skouri-Panet F, Gugger M, Chauvat F, Cassier-Chauvat C. The diversity of molecular mechanisms of carbonate biomineralization by bacteria. *Discov Mater.* 2021;1(1):2.
13. Couradeau E, Benzerara K, Gérard E, Moreira D, Bernard S, Brown GE, et al. An Early-Branching Microbialite Cyanobacterium Forms Intracellular Carbonates. *Science.* 2012;336(6080):459–62.
14. Benzerara K, Skouri-Panet F, Li J, Ferard C, Gugger M, Laurent T, et al. Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014;111(30):10933–8.
15. Monteil CL, Benzerara K, Menguy N, Bidaud C, Michot-Achdjian E, Bolzoni R, et al. Intracellular amorphous Ca-carbonate and magnetite biomineralization by a magnetotactic bacterium affiliated to the Alphaproteobacteria. *ISME J.* 2021;15(1):1–18.
16. Mehta N, Gaëtan J, Giura P, Azaïs T, Benzerara K. Detection of biogenic amorphous calcium carbonate (ACC) formed by bacteria using FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2022;121262.
17. Politi Y, Metzler RA, Abrecht M, Gilbert B, Wilt FH, Sagi I, et al. Transformation mechanism of amorphous calcium carbonate into calcite in the sea urchin larval spicule. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2008;105(45):17362–6.
18. Mehta N, Vantelon D, Gaëtan J, Fernandez-Martinez A, Benzerara K. Calcium speciation and coordination environment in intracellular amorphous calcium carbonate (ACC) formed by cyanobacteria. *Chemical Geology.* in rev.;

19. O'Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*. 2012;14:313–34.
20. Humbert JF, Barbe V, Latifi A, Gugger M, Calteau A, Coursin T, et al. A Tribute to Disorder in the Genome of the Bloom-Forming Freshwater Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *PLOS ONE*. 2013;8(8):e70747.
21. Pérez-Carrascal OM, Terrat Y, Giani A, Fortin N, Greer CW, Tromas N, et al. Coherence of *Microcystis* species revealed through population genomics. *ISME J*. 2019;13(12):2887–900.

Annexe n°1 : Données supplémentaires

2 Données supplémentaires du Chapitre 3

Tableau SII.I Liste des échantillons collectés sur les sites de Cergy et Verneuil

Tableau SII.II Proportion des différents taxa de phytoplancton dans les étangs de Cergy et Verneuil.

Tableau SII.III Liste des pics identifiés sur les spectres FTIR de la matière en suspension des sites de Cergy et Verneuil

Les tableaux SII.I à III sont disponible à l'adresse suivante :

<https://filesender.renater.fr/?s=download&token=f0146ff5-7c9a-4f55-9e7b-866e02805d41>.

Tableau SIII.IV Quantification des bactéries (bac), cyanobactéries (cyano), des *Microcystis* (Mic) totales, et du gène *ccyA* par qPCR . Les données sont exprimées en copies.mL⁻¹ et la moyenne est faite sur trois triplicats techniques.

Sites	Date	ADN_16S_bac	ADN_16S_cyano	ADN_16S_Mic	ADN_ccyA	Population ccyA - (ccyA + - 16S-Mic x 1,3)
Cergy	19/06/2021	2.93E+07 ± 9.80E+06	6.94E+04 ± 5.47E+04	2.41E+04 ± 4.33E+03	1.09E+03 ± 1.21E+03	1.74E+04 ± 4.49E+03
Cergy	20/07/2021	3.22E+06 ± 4.27E+05	2.04E+04 ± 1.30E+04	1.32E+04 ± 3.57E+03	7.94E+02 ± 4.06E+02	9.34E+03 ± 3.59E+03
Cergy	18/08/2021	1.24E+07 ± 1.27E+06	4.45E+05 ± 2.95E+05	3.84E+05 ± 7.61E+04	1.30E+04 ± 4.39E+03	2.82E+05 ± 7.62E+04
Cergy	25/08/2021	1.67E+07 ± 1.64E+06	4.93E+05 ± 3.37E+05	2.00E+05 ± 2.93E+04	1.72E+04 ± 3.58E+03	1.37E+05 ± 2.96E+04
Cergy	07/09/2021	1.05E+07 ± 8.96E+05	1.61E+04 ± 1.15E+04	5.33E+03 ± 1.01E+03	2.45E+03 ± 1.05E+03	1.64E+03 ± 1.46E+03
Cergy	15/09/2021	7.52E+06 ± 6.76E+04	9.28E+03 ± 3.95E+03	4.97E+03 ± 8.93E+02	6.69E+02 ± 2.22E+02	3.15E+03 ± 9.20E+02
Cergy	29/09/2021	4.06E+06 ± 7.35E+05	3.44E+03 ± 1.95E+03	8.61E+02 ± 2.86E+02	4.12E+02 ± 3.86E+01	2.51E+02 ± 2.89E+02
Cergy	06/10/2021	1.04E+07 ± 1.42E+06	3.45E+03 ± 1.59E+03	1.43E+03 ± 3.72E+02	2.54E+02 ± 1.06E+02	8.45E+02 ± 3.87E+02
Cergy	13/10/2021	6.24E+06 ± 1.09E+06	4.69E+03 ± 2.33E+03	1.18E+03 ± 3.63E+02	3.26E+02 ± 8.71E+01	5.81E+02 ± 3.73E+02
Cergy	20/10/2021	7.84E+06 ± 7.33E+05	3.52E+03 ± 1.68E+03	1.14E+03 ± 3.41E+02	6.05E+02 ± 6.97E+01	2.69E+02 ± 3.48E+02
Verneuil	19/06/2021	2.18E+07 ± 2.25E+06	4.08E+03 ± 2.11E+03	1.82E+03 ± 8.30E+02	4.32E+02 ± 3.36E+02	9.67E+02 ± 8.95E+02
Verneuil	20/07/2021	1.59E+07 ± 8.17E+05	8.59E+03 ± 6.39E+03	2.46E+03 ± 5.82E+02	4.25E+02 ± 2.60E+02	1.47E+03 ± 6.37E+02
Verneuil	18/08/2021	1.70E+07 ± 2.24E+06	3.78E+05 ± 3.18E+05	5.66E+05 ± 5.68E+04	2.94E+04 ± 5.40E+03	4.06E+05 ± 5.71E+04
Verneuil	25/08/2021	1.08E+07 ± 8.97E+05	1.72E+05 ± 1.47E+05	1.23E+05 ± 1.25E+04	5.22E+03 ± 6.19E+02	8.98E+04 ± 1.25E+04
Verneuil	07/09/2021	6.44E+07 ± 9.73E+06	2.02E+05 ± 1.14E+05	7.63E+04 ± 1.97E+04	1.76E+03 ± 1.77E+03	5.69E+04 ± 1.98E+04
Verneuil	15/09/2021	6.01E+07 ± 3.92E+06	2.17E+06 ± 1.47E+06	9.70E+05 ± 7.09E+04	1.86E+04 ± 3.91E+03	7.27E+05 ± 7.11E+04
Verneuil	29/09/2021	6.40E+07 ± 9.21E+06	1.13E+06 ± 1.00E+06	4.41E+05 ± 1.79E+04	1.39E+04 ± 4.41E+03	3.25E+05 ± 1.84E+04
Verneuil	06/10/2021	3.37E+07 ± 8.42E+06	2.93E+05 ± 2.14E+05	1.13E+05 ± 1.60E+04	1.70E+04 ± 4.54E+03	7.01E+04 ± 1.66E+04
Verneuil	13/10/2021	1.37E+07 ± 1.54E+06	1.65E+05 ± 1.26E+05	7.02E+04 ± 6.27E+03	2.50E+04 ± 5.70E+03	2.90E+04 ± 8.48E+03
Verneuil	20/10/2021	1.13E+07 ± 1.64E+06	1.96E+04 ± 1.45E+04	7.35E+03 ± 1.11E+03	2.87E+03 ± 8.29E+02	2.79E+03 ± 1.39E+03

Tableau SIII.IV Quantification de l'expression du gène 16S des bactéries (bac), cyanobactéries (cyano), des *Microcystis* (Mic) totales, et du gène *ccyA* par qPCR . Les données sont exprimées en copies.mL⁻¹ et la moyenne est faite sur trois triplicats techniques.

Sites	Date	ARN_16S_bac	ARN_16S_cyano	ARN_16S_Mic	ARN_ccyA
Cergy	19/06/2021	3.70E+08 ± 1.66E+08	4.66E+07 ± 3.31E+07	2.01E+06 ± 5.59E+05	NA
Cergy	20/07/2021	1.79E+06 ± 9.78E+05	3.64E+05 ± 3.21E+05	7.75E+04 ± 2.03E+04	NA
Cergy	18/08/2021	1.49E+07 ± 6.11E+06	1.26E+07 ± 1.12E+07	1.19E+06 ± 5.54E+05	NA
Cergy	25/08/2021	4.18E+08 ± 2.27E+08	1.57E+08 ± 1.26E+08	6.85E+06 ± 1.88E+06	NA
Cergy	07/09/2021	7.68E+07 ± 1.29E+08	6.36E+05 ± 4.66E+05	1.51E+05 ± 5.27E+04	NA
Cergy	15/09/2021	3.09E+07 ± 1.66E+07	1.67E+06 ± 1.42E+06	1.45E+05 ± 3.29E+04	NA
Cergy	29/09/2021	2.15E+07 ± 1.21E+07	6.04E+06 ± 9.05E+06	7.41E+04 ± 2.45E+04	NA
Cergy	06/10/2021	4.61E+07 ± 2.68E+07	3.36E+06 ± 4.82E+06	7.33E+04 ± 2.38E+04	NA
Cergy	13/10/2021	3.10E+07 ± 1.63E+07	1.49E+06 ± 1.17E+06	7.01E+04 ± 1.95E+04	NA
Cergy	20/10/2021	2.64E+08 ± 1.75E+08	2.55E+06 ± 2.23E+06	1.65E+05 ± 4.77E+04	NA
Verneuil	19/06/2021	1.33E+09 ± 7.88E+08	7.02E+06 ± 6.01E+06	3.58E+05 ± 8.22E+04	NA
Verneuil	20/07/2021	4.85E+07 ± 2.24E+07	5.25E+05 ± 5.51E+05	6.74E+04 ± 1.75E+04	NA
Verneuil	18/08/2021	4.37E+08 ± 2.76E+08	1.59E+08 ± 1.51E+08	1.43E+07 ± 4.42E+06	NA
Verneuil	25/08/2021	4.84E+08 ± 3.52E+08	1.84E+08 ± 1.38E+08	1.06E+07 ± 3.37E+06	NA
Verneuil	07/09/2021	2.97E+09 ± 1.58E+09	1.72E+08 ± 1.08E+08	1.27E+07 ± 4.76E+06	NA
Verneuil	15/09/2021	2.24E+09 ± 9.90E+08	1.55E+09 ± 1.19E+09	1.19E+08 ± 7.18E+07	NA
Verneuil	29/09/2021	1.00E+09 ± 7.39E+08	2.84E+08 ± 2.34E+08	2.04E+07 ± 4.42E+06	NA
Verneuil	06/10/2021	2.51E+09 ± 1.46E+09	6.95E+08 ± 1.00E+09	2.21E+07 ± 3.07E+06	NA
Verneuil	13/10/2021	2.46E+08 ± 1.49E+08	1.76E+07 ± 1.53E+07	1.80E+06 ± 5.32E+05	NA
Verneuil	20/10/2021	5.69E+06 ± 3.26E+06	1.48E+06 ± 2.40E+06	3.88E+04 ± 1.49E+04	NA

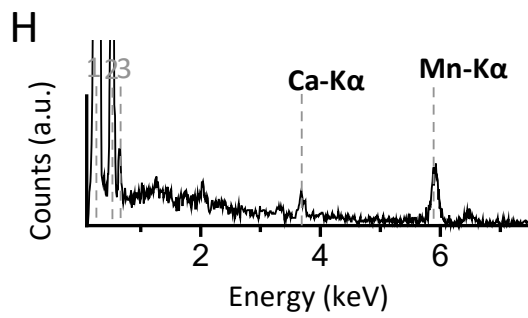
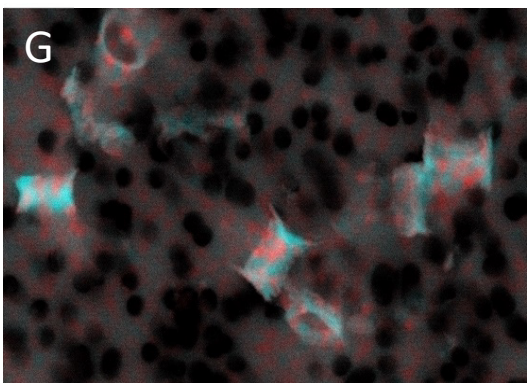
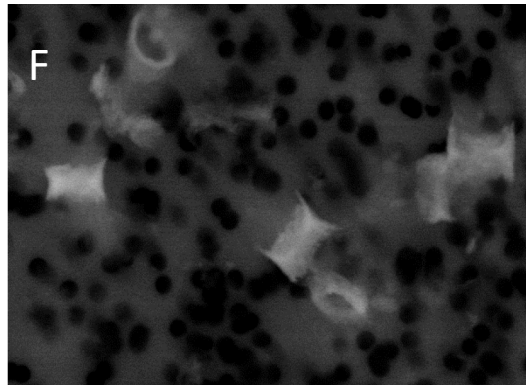
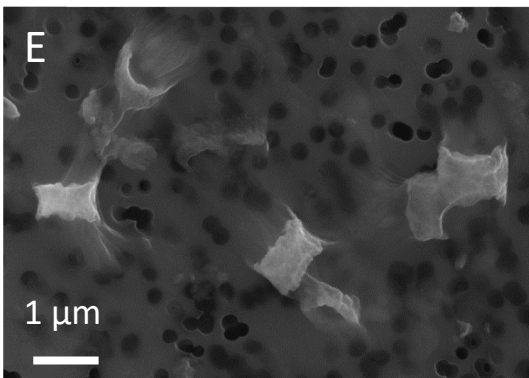
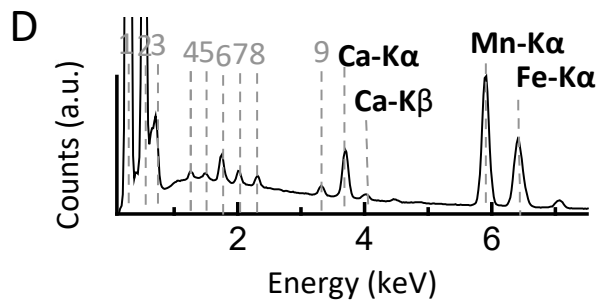
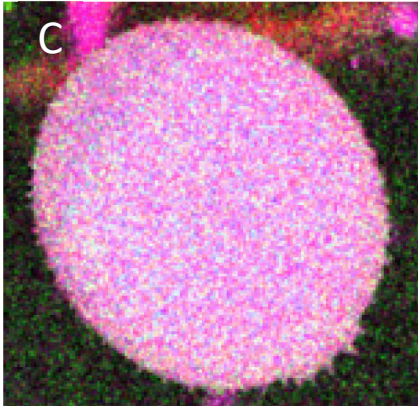
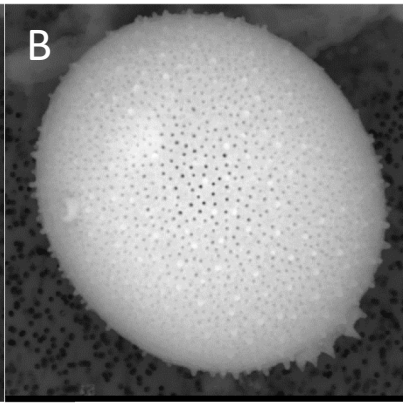
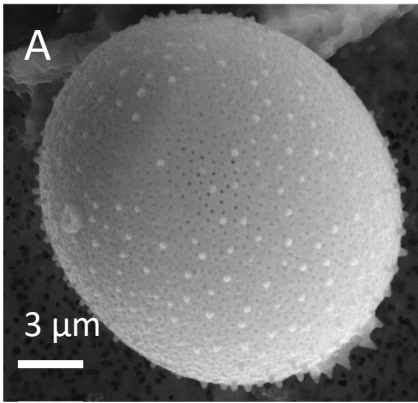


Figure S3.1 Analyses par microscopie électronique à balayage (MEB) représentatives de la diversité des phases riches dans la matière particulaire du site de Cergy (A) Image MEB en mode de détection SE2 (B) Superposition correspondante de l'image AsB et des cartes MEB-EDX du Ca (rouge), Si (rose), Mg (cyan), S (jaune), P (vert), Al (orange), Fe (Vert clair) et Mn (bleu foncé)(C) Spectres de rayons X à dispersion d'énergie (EDXS) correspondants aux encarts 1 et 2 dans l'image B. (E à H) Données du même type. Les étiquettes des lignes d'émission dans les spectres EDXS sont : (1) : C K α et (2) O K α . K α (4) Mg (5) Al K α . (6) : Si K α et (7) P K α . (8) : S K α et (9) Fe K α . (1) : C K α et (2) O K α .

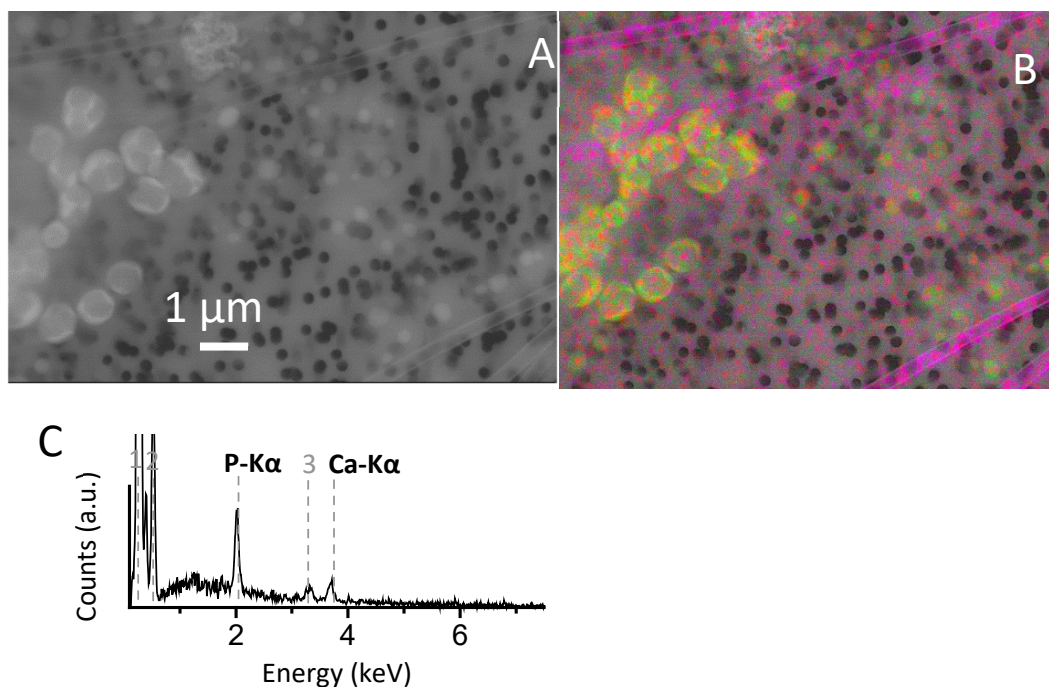


Figure 0.2 Analyses MEB de cyanobactéries formant PolyP dans l'étang des Galets (Cergy) (A) Images MEB en mode de détection AsB d'une vue rapprochée des cellules de *Microcystis*. (B) Superposition correspondante de l'image AsB et des cartes SEM-EDX de Ca (rouge) et P (vert) et Si(rose) Les granules de PolyP apparaissent en vert. (D) Spectre EDXS des granules de polyP.. Les étiquettes des lignes d'émission dans les spectres EDXS sont : (1) : C K α ; (2) N K α ; (3) O K α ; (4) Al K α ; (5) K K α .

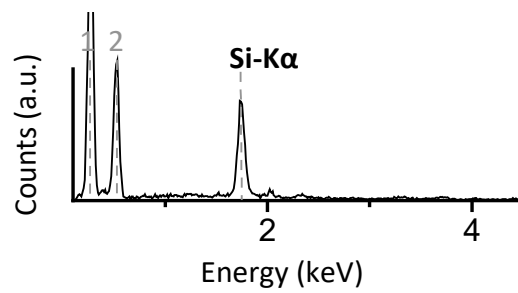
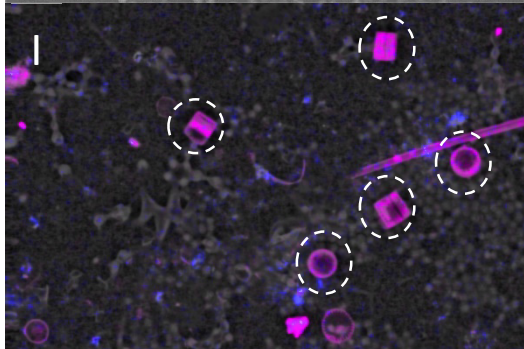
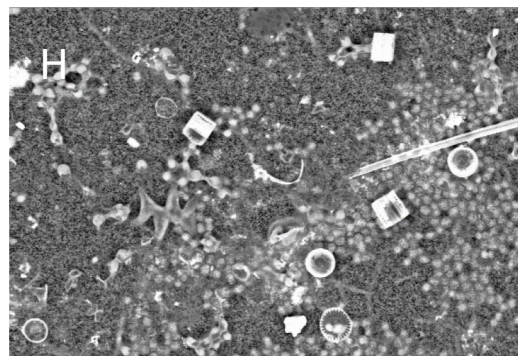
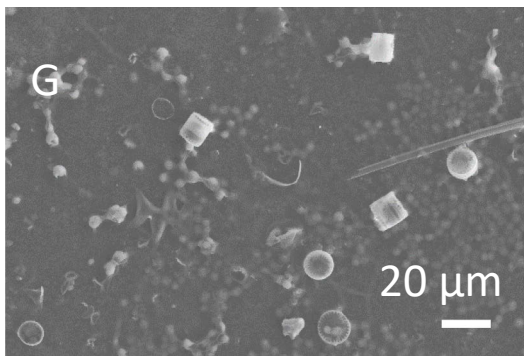
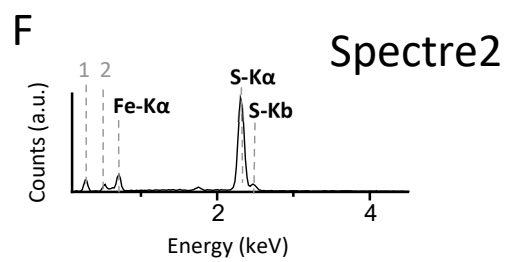
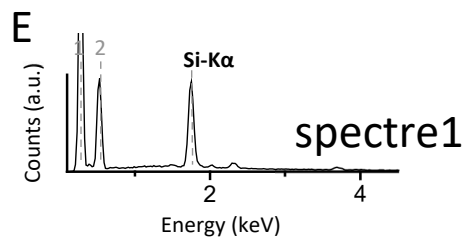
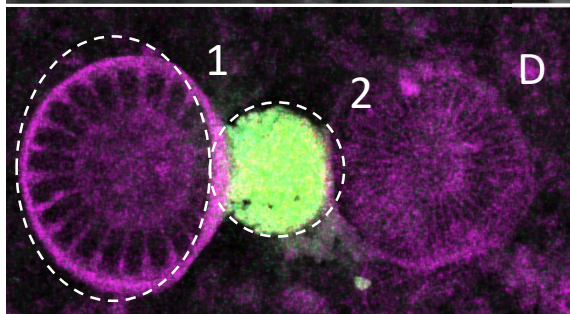
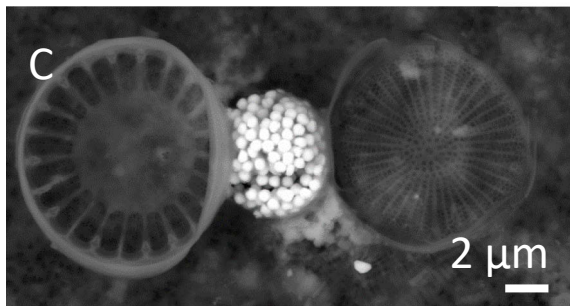
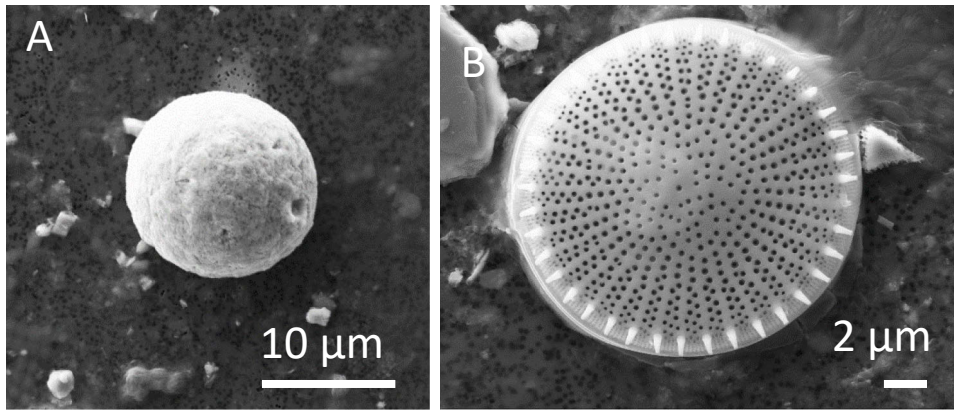


Figure S3.3 Analyses par microscopie électronique à balayage (MEB) représentatives de la diversité des phases dans la matière particulaire du site de Verneuil (A) Image MEB en mode de détection SE2 d'un test de *Phacotis* (B) Image MEB en mode de détection SE2 d'une diatomée (C) Image MEB en mode de détection SE2 de diatomées et d'une pyrite framboïde (D) Superposition correspondante de l'image AsB et des cartes MEB-EDX du Si (rose), S (jaune), Fe (Vert clair) (C) Spectres de rayons X à dispersion d'énergie (EDXS) correspondants aux encarts 1 et 2 dans l'image D. (E à H) Données du même type sur des diatomées. Les étiquettes des lignes d'émission dans les spectres EDXS sont : (1) : C K α et (2) O K α . K α (4) Mg (5) Al K α . (6) : Si K α et (7) P K α . (8) : S K α et (9) Fe K α . (1) : C K α et (2) O K α .

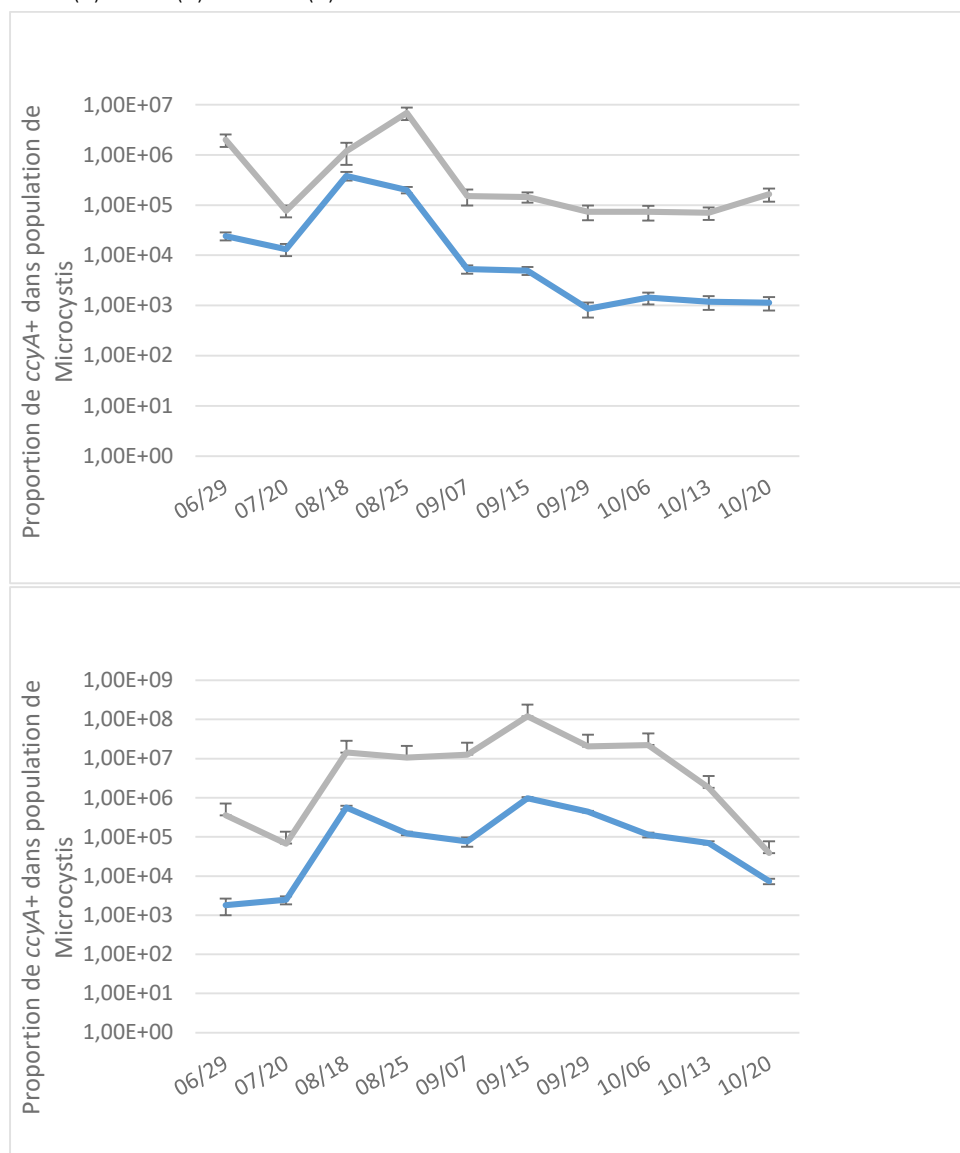


Figure S3.4. Comparaison entre la quantification du gène ADNr 16S spécifique de *Microcystis* (courbe bleue) et son expression (courbe grise) en nombre de copie.mL⁻¹ d'eau de lac pour (A) l'étang des Galets (Cergy) et (B) l'étang de la Grosse Pierre (Verneuil). Les barres d'erreurs sont obtenus via triplicats techniques.

Annexe n°2



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa

Detection of biogenic amorphous calcium carbonate (ACC) formed by bacteria using FTIR spectroscopy



Neha Mehta^a, Juliette Gaëtan^a, Paola Giura^a, Thierry Azais^b, Karim Benzerara^{a,*}

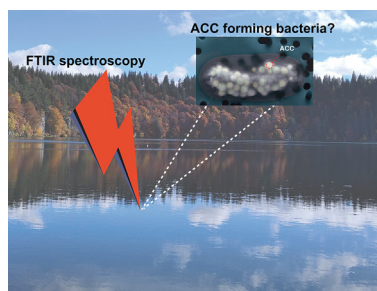
^aSorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France

^bSorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France

HIGHLIGHTS

- Intact cells of ACC-forming cyanobacteria probed using FTIR spectroscopy across mid-IR, near-IR and far-IR.
- IR bands at $\sim 860\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 306\text{ cm}^{-1}$ identified as diagnostic spectral markers to rapidly detect bacterial ACC at a bulk scale.
- Using FTIR spectroscopy, several cyanobacterial are newly shown to form ACC.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2022

Received in revised form 28 March 2022

Accepted 10 April 2022

Available online 30 April 2022

Keywords:

Amorphous calcium carbonate

FTIR

Cyanobacteria

ACC

Calcium

ABSTRACT

While the formation of intracellular amorphous calcium carbonate (ACC) by living organisms is widespread, its detection in prokaryotes remains difficult owing to its susceptibility to transform or dissolve upon sample preparation. Because of these challenges, a large number of ACC-forming prokaryotes may have been undetected and their abundance in the natural environment is possibly underestimated. This study identifies diagnostic spectral markers of ACC-forming prokaryotes that facilitate their detection in the environment. Accordingly, ACC formed by cyanobacteria was characterized using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in near-IR, mid-IR, and far-IR spectral regions. Two characteristic FTIR vibrations of ACC, at $\sim 860\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 306\text{ cm}^{-1}$, were identified as reliable spectral probes to rapidly detect prokaryotic ACC. Using these spectral probes, several *Microcystis* strains whose ACC-forming capability was unknown, were tested. Four out of eight *Microcystis* strains were identified as possessing ACC-forming capability and these findings were confirmed by scanning electron microscopy (SEM) observations. Overall, our findings provide a systematic characterization of prokaryotic ACC that facilitate rapid detection of ACC forming prokaryotes in the environment, a prerequisite to shed light on the role of ACC-forming prokaryotes in the geochemical cycle of Ca in the environment.

© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: ACC, amorphous calcium carbonate; FTIR, Fourier transform infrared.

* Corresponding author.

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121262>

1386-1425/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Compared to the crystalline polymorphs of calcium carbonate (CaCO_3) such as calcite, vaterite and aragonite, amorphous calcium carbonate (ACC) is more soluble and therefore fairly unstable except in several biotic cases [1]. Biogenic ACC was first docu-

mented in eukaryotic organisms such as mollusks, sea urchins, sponges, ascidians, and crustaceans, where ACC acts as a precursor phase for the formation of calcite and aragonite minerals in skeletal architectures [1–6]. Several studies have shown that diverse prokaryotic organisms are also capable of forming ACC. For example, the large uncultured sulfur bacterium *Achromatium oxaliferum*, widely distributed at the oxic-anoxic boundary in sediments of freshwater, brackish, and marine environments, was shown to form numerous intracellular ACC inclusions filling most of the cell volume [7]. Recently, a magnetotactic bacterium affiliated to the Alphaproteobacteria was shown to form intracellular ACC [8]. The repertoire of prokaryotes forming ACC also includes numerous phylogenetically diverse cyanobacteria [9,10]. Detection of biogenic ACC in cyanobacteria was particularly interesting because they are the only known ACC-forming prokaryotes that are culturable in the laboratory. These strains have the highest Ca demand among all cyanobacteria, hypothesized to be driven by their need to form intracellular ACC, which suggests a biological function of ACC. This role possibly consists in an intracellular pH buffer or a storage form of inorganic carbon and/or Ca [11,12]. The formation of ACC by bacteria has significant geochemical implications. First, intracellular ACC inclusions formed by some strains were shown to be associated with their capability to strongly accumulate radioactive alkaline earth elements such as ^{90}Sr and ^{226}Ra , offering some potential for remediating pollutions by these elements [13]. Moreover, some strains of ACC-forming cyanobacteria are shown to sequester high concentrations of alkaline earth elements such as Ba and Sr. This raises questions about the current understanding of the biological role of Ba/Sr in cyanobacteria and, in reverse, the role of these cyanobacteria in the geochemical cycling of Ba and Sr, especially in environments where they might be abundant [11,14–16]. The biogeochemical implications of bacterial ACC are not only limited to cyanobacteria. Owing to the exceptional size of *A.oxaliferum*, often >17 μm in length and 10 μm in width, ACC within *A.oxaliferum* cells can represent most of the solid calcium present in some sediments [17].

Despite the increasing number of reports about ACC-forming prokaryotes and their biogeochemical significance, detection of ACC in prokaryotes remains a difficult task. Pure abiogenic ACC is highly unstable, transforming within minutes to crystalline calcium carbonate polymorphs such as calcite, or aragonite [18]. In contrast, ACC found in prokaryotes remains relatively stable intracellularly with no obvious spontaneous transformation to crystalline phases such as calcite. The mechanisms underlying such an unprecedented stability of biogenic ACC remain unknown. Various organic or inorganic additives (Mg, P) and/or confinement of ACC within small volumes, have been shown to stabilize ACC [19–22]. This stabilization process is interrupted upon cell lysis, or cell death, which therefore induces ACC loss. Techniques such as scanning electron microscope (SEM) with energy dispersive X-ray spectrometry (EDXS), transmission electron microscope (TEM) with EDXS, and Raman microspectroscopy (but not for ACC in autofluorescent cyanobacteria) have been successfully used to detect ACC in bacteria [23,24] (Table 1). While these techniques are interesting as they provide information at the single-cell scale, their use is time-consuming, which can become prohibitive when several samples (e.g., a screening of numerous bacterial strains) require a preliminary confirmation of the presence or absence of ACC, and when a more global average view of the ACC content of a sample is needed. Moreover, it has been shown that bacterial ACC can be lost and/or transformed upon some sample preparation protocols (Table 1) [8,23]. Because of these challenges, a large number of ACC-forming prokaryotes may have remained undetected and their abundance in the natural environment possibly underestimated. Overall, there is thus a need for the use of techniques

Table 1

Summary of techniques used for characterization of ACC in bacteria and their limitations.

Technique	Limitation
Scanning electron microscopy (SEM) with energy dispersive X-ray spectrometry (EDXS) [23]	ACC prone to loss upon fixation during sample preparation; time consuming to derive a global average view; no discrimination between crystalline and amorphous phases
Transmission electron microscopy with energy dispersive X-ray spectrometry (TEM-EDXS) [23,8]	ACC prone to loss upon fixation and sample preparation; time consuming to derive a global average view
Raman microspectroscopy [24]	may induce ACC crystallization when using high-intensity lasers; Raman signal is overwhelmed by auto-fluorescence in ACC-forming cyanobacteria

allowing efficient detection of ACC in these complex samples with minimal sample preparation.

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy is one of the most commonly used vibrational spectroscopies (e.g. [25–28]), capable of rapidly detecting CaCO_3 polymorphs *in situ*, non-destructively, and without complex sample preparation, making it an ideal approach for detection of ACC in prokaryotes at a bulk scale. FTIR spectroscopy has been a popular choice to study the kinetics of ACC crystallization in eukaryotic biominerals (e.g. [2,29]) and abiotic carbonates (e.g. [30–32]). In the mid-IR region, crystalline carbonate phases such as calcite have distinct bands at $\sim 714\text{ cm}^{-1}$ (ν_4), $\sim 866\text{ cm}^{-1}$ (ν_2), $\sim 1084\text{ cm}^{-1}$ (ν_1) and $1420\text{--}1470\text{ cm}^{-1}$ (ν_3). ACC shares $\nu_1\text{--}\nu_3$ vibrations with crystalline CaCO_3 but lacks the distinct vibrational band at $\sim 714\text{ cm}^{-1}$ and has an additional shoulder on the ν_3 band [33]. The lack of ν_4 band in ACC along with the characteristic ν_3 shoulder have been used extensively as a diagnostic feature to detect biogenic ACC present in various eukaryotic carbonates such as spicules of ascidian [6], spicules of sea urchin [29], fish-gut carbonates [34], and earthworm secreted carbonate granules [35]. In eukaryotic carbonates, where crystalline CaCO_3 coexists with ACC, the ν_3/ν_4 and ν_2/ν_4 peak intensity ratios have been shown to provide semi-quantitative information on the fraction of amorphous and crystalline phases [18,35]. Unlike the mid-IR spectral range, the far-infrared (FIR) spectral region ($80\text{--}650\text{ cm}^{-1}$) offers valuable insights about lower energy lattice vibrations that correspond to vibrations among different carbonate units [36]. Brusentsova et al. compiled a comprehensive dataset of FIR spectra measured on several reference crystalline carbonate polymorphs, but no dataset exists for synthetic or biogenic ACC [37]. While FTIR spectroscopy has been widely used as a tool to detect ACC in eukaryotic carbonates, the application of FTIR spectroscopy to the detection of prokaryotic ACC is limited and not straightforward [38]. Unlike eukaryotic carbonates that are typically composed of a large fraction of crystalline carbonate with ACC and low organic content, prokaryotic ACC consists of a low ACC content mixed with high organic content. Indeed, they are commonly found at low abundance in the environment and surrounded by a complex assemblage of cellular biomolecules [38,39]. The high organic content could mask the characteristic asymmetric vibration (ν_3) band in the $1500\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ region and the symmetric vibration band (ν_4) at 714 cm^{-1} due to overlapping bands from proteins (amide I and II peaks) and rocking vibration of methylene group of long-chain alkanes [40]. Such interferences may prevent the direct use of diagnostic indicators of ACC (e.g., absence of ν_4 band), previously established based on eukaryotes [39–41]. Mechanically separating the organics from ACC in prokaryotes does not appear as a viable

approach as this may result in the rapid transformation of ACC outside the cell, as mentioned previously. Owing to these complications, the question remains as to what IR spectral features of ACC are suitable for its detection in systems dominated by prokaryotes?

Within this context, we conduct a comprehensive study of the key spectral features of ACC across the near-IR, mid-IR and far-IR, spectral range in ACC-forming cyanobacteria and test these features in a set of cyanobacterial strains whose ACC-forming capabilities remain unknown.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of abiotic ACC

An abiotic amorphous calcium/magnesium carbonate (referred as ACC hereafter) was prepared in-house following the protocol described in [42]. The sample was precipitated by mixing two 100 ml solutions: (i) an aqueous carbonate solution containing 0.05 M of K_2CO_3 (pH = 11.4); and (ii) an aqueous calcium and magnesium solution containing 0.045 M of $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Sigma-Aldrich) and 0.053 M of $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (adjusted to pH = 8.6). The calcium- and magnesium-containing solution was poured directly into the carbonate solution. The resulting precipitate was isolated by centrifugation, washed twice with anhydrous ethanol, and dried at 37 °C for 7 days. Bulk mineralogy of the dried powder was analyzed using a Panalytical powder X-ray diffractometer, equipped with a Co-anode X-ray source. Patterns were recorded between 2θ = 3–70°, with 0.001° steps and 2 ms/step. The characterization of synthesized ACC using X-ray diffraction (XRD) showed only broad peaks, confirming that the synthesis resulted in an amorphous phase (Fig. S1). Synthesized ACC was stored at room temperature in a desiccator. The synthesized ACC remained amorphous for at least 1 year, as confirmed by XRD (data not shown). Thermogravimetric analysis-differential scanning calorimetry (TGA-DSC) analyses were performed using a SDT Q 600 TA. About 15 mg of powder were placed in an aluminum crucible and the sample was heated up to 900 °C under a 100 ml-per-minute nitrogen flow. The temperature scan rate was set at 5 °C per minute. Mass spectrometry analyses were coupled with the TGA-DSC analyses using a ThermoStare GSD 301 T3 (Pfeiffer Vacuum). The signal corresponding to 44 amu (CO_2) and 18 amu (H_2O) were recorded.

2.2. Culture conditions for cyanobacteria strains

Here, we will refer to strains forming intracellular ACC as ACC+ strains, and strains not forming intracellular ACC as ACC- strains. Two reference strains, *Synechocystis* PCC 6803 (ACC-) and *Cyanotheca* PCC 7425 (ACC+) were cultured in the BG-11 medium, a standard growth medium used for freshwater cyanobacteria and the chemical composition of which is provided in Stanier et al. [43]. Cultures were grown with agitation and continuous light (5–10 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$). When cell suspensions reached an optical density of ~ 1 , cells were harvested by centrifugation, rinsed, and dried at 40 °C for 48 h. In addition, *Microcystis* spp. strains from the Paris Museum Collection (PMC) were included in this study as strains whose capacity to form intracellular ACC was initially unknown. Eight different *Microcystis* strains were cultured to reflect some phenotypic diversity. These strains were grown in the standard BG-11 medium, without agitation, at 23 °C, with a 12:12 photoperiod and a light intensity of $\sim 5 \mu mol m^{-2} s^{-1}$. The cells were harvested via centrifugation and dried at 40 °C for 48 h. The total Ca concentration of the dried biomass was measured by acid digestion using inductively coupled plasma - optical emission spectrometry (ICP-OES).

2.3. SEM analysis

Microcystis cell suspensions were filtered on 0.22 μm polyether-sulfone (PES) filters, then rinsed three times with 10 ml MilliQ® water. The filters were dried at ambient temperature and mounted on aluminum stubs using double-sided carbon tape. The samples were carbon coated prior to SEM analyses. Scanning electron microscopy (SEM) observations were performed using a Zeiss Ultra55 SEM at IMPMC. The electron accelerating voltage used was 10 or 15 kV with a working distance of 7.5 mm and a 60 μm aperture. Images were collected with a backscattered electron detector (AsB detector) and the maps of the different elements (Ca, P, K, Mg, Si, Fe) were retrieved from energy dispersive X-ray spectrometry (EDXS) hyperspectral data (HyperMap).

2.4. FTIR spectroscopy analyses

The abiotic ACC and dried biomass of the different strains were finely ground in an agate mortar. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectra were acquired over the mid-IR region (4000–600 cm^{-1}) using a NICOLET 6700 FTIR spectrometer equipped with a diamond internal reflection element (IRE), a KBr beam splitter and a mercury cadmium telluride (MCT) detector. The sample was mounted on the diamond IRE. Spectra were accumulated by collecting 64–100 scans with a resolution of 1 cm^{-1} . Spectra processing including baseline correction, normalization, and peak fit was carried out using the Origin software™. Baseline corrected mid-IR spectra were fitted using a peak analyzer (based on the Levenberg-Marquardt algorithm). All biomass spectra were fitted in the 945 ± 5 to $845 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ frequency range. The initial peak position was determined by the local maximum method, which finds the frequency corresponding to the local maximum within the 20-point range. The spectra were fitted with linear combinations of Voigt lineshapes, the centroids of which were initially set to values determined from the local maxima peak analysis and remained unfixed during the fit unless noted otherwise. The baseline was fixed for the fit (cf. section 3.3). The area under the spectrum and above the background was used for spectral normalization (cf. section 3.4).

For the near-infrared analyses, bi-directional reflectance spectra were obtained using the SHADOWS instrument [44] in the 500–4000 nm (20000–2500 cm^{-1}) spectral range. Samples were deposited in a cylindrical sample holder (13 mm in diameter, 5 mm in depth) and measured under a standard observation geometry (incidence = 0°, emergence = 30°, phase = 30°). Spectra were calibrated using the spectral reflectance spectralon™ and infragold™ and corrected for the non-lambertian behavior of spectralon. Last, for far infrared analysis, approximately 6 mg of dried sample were mixed with 80 mg of polyethylene (PE). Pellets were formed in a vacuum press under ten tons of pressure for ~ 5 min, and spectra were acquired in transmission mode using the Bruker IFS 66v/s FTIR spectrometer in the 600–50 cm^{-1} spectral range, at a resolution of 4 cm^{-1} and using a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector and a multilayer mylar beam splitter. No baseline correction was performed because it was difficult to define and subtract a baseline accurately.

3. Results and discussion

3.1. Spectral features of synthetic ACC across near-IR, mid-IR and far-IR

The characteristic peaks of synthetic ACC across the spectral range of 20,000–50 cm^{-1} are shown in Fig. 1 and summarized in Table S1. The band assignments of the IR peaks observed in ACC

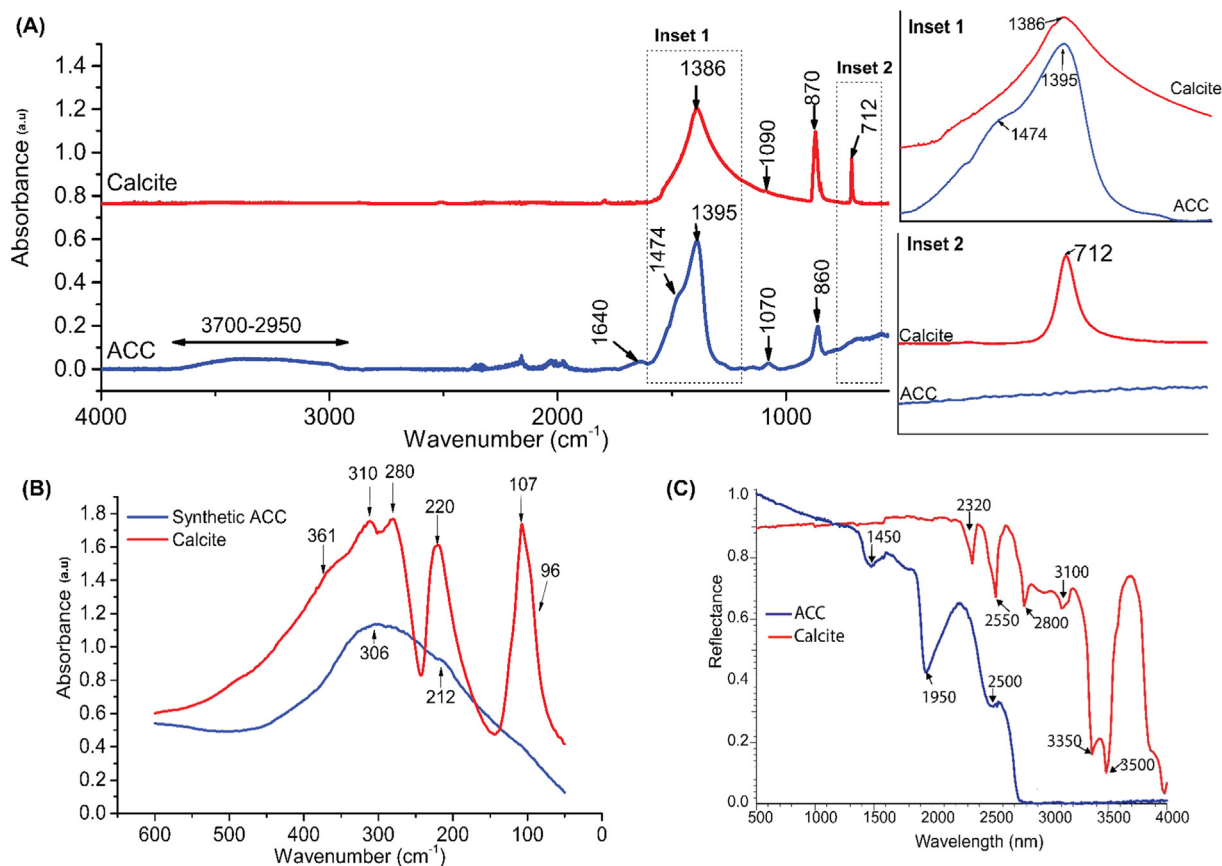


Fig. 1. (A) ATR-FTIR spectra of synthetic ACC and calcite in the mid-IR spectral range. The arrows correspond to characteristic mid-IR active frequencies of ACC. The dashed rectangle envelops the zoomed regions of mid-IR ACC spectra shown in the inset 1 ($1500\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$) and inset 2 ($750\text{--}680\text{ cm}^{-1}$). The bands between 2500 and 2000 cm^{-1} in ACC spectra are due to ambient CO_2 and insufficient purging of the sample chamber. (B) Far-IR spectra of synthetic ACC, and calcite. Arrows denote the characteristic features of ACC and calcite. (C) Near-IR spectra of synthetic ACC, and calcite. Details on the assignment of the vibrations of ACC across the entire region are listed in Table S1. The X-axis is in wavelength, where 500 nm corresponds to $2 \times 10^4\text{ cm}^{-1}$ and 4000 nm corresponds to $2.5 \times 10^3\text{ cm}^{-1}$.

are listed in Table S1. In the mid-IR spectral region, ACC is specifically indicated by the presence of a shoulder at 1474 cm^{-1} and the absence of a peak at 712 cm^{-1} (Fig. 1, Inset 1–2)[32]. This spectral range also showed for ACC a broad band between 2950 and 3700 cm^{-1} (O-H stretching) and at 1650 cm^{-1} (O-H bending), both corresponding to structural water within ACC[32]. Consistently, the water content in ACC was estimated to 17 wt% (corresponding to 0.94 mol of water per carbonate) based on TGA-DSC-MS analyses (Fig. S2). The out-of-plane bending absorption (ν_2) at $\sim 860\text{ cm}^{-1}$ (FWHM = 25 cm^{-1}) was observed. This band is sensitive to differences in chemical environment changes from amorphous to crystalline forms [30]. Indeed, with the transformation of an amorphous phase to a crystalline phase, the ν_2 band position shifts from 860 cm^{-1} (ACC) to 870 cm^{-1} (calcite) (Fig. 1A). The ν_2 band position is also sensitive to the Mg content in ACC: the band shifts towards lower wavenumbers with increasing Mg content in ACC and can vary between 860 and 864 cm^{-1} [20,27]. The remaining bands in the mid-IR spectral range were characteristic vibrations of the carbonate ion and are common in both ACC and crystalline polymorph[32].

In the FIR region, ACC shows a broad peak around $\sim 306\text{ cm}^{-1}$ and a weak shoulder on this broad peak at $\sim 212\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 1B). For comparison, calcite FIR spectra show several sharp peaks at 310 (with a shoulder at 361), 280 , 220 , 107 (shoulder at 96) cm^{-1} , consistent with previous studies (e.g. [36,37]). These sharp bands are due to IR-active collective lattice vibrational modes that involve relative translations of the calcium and carbonate ions. In contrast, ACC is rotationally disordered which results in a broad

envelope across the available frequencies [45]. Lastly, in the NIR region, the ACC spectra is dominated by broad absorption peaks at 1450 nm (6896 cm^{-1}), 1950 nm (5128 cm^{-1}), 2500 nm (4000 cm^{-1}), and the absence of absorption bands beyond $\sim 2500\text{ nm}$ (Fig. 1C). The peaks $< 2500\text{ nm}$ are attributed to O-H stretching overtones originating from structural and/or weakly bonded water[46]. Above 2500 nm the reflectance is close to zero, because of the saturation of the fundamental OH stretching mode. Moreover, the typical carbonate vibrations in region $> 2500\text{ nm}$ (see calcite NIR spectra in Fig. 1C) are masked by strong water-related absorption bands in ACC [47,48,49]. Overall, due to the presence of water in ACC, the NIR region offers no diagnostic spectral features of ACC.

Several key insights can be drawn from the above analyses. All bands of ACC in the NIR region are masked by structural water. Almost all biological occurrences of ACC are known to be hydrous, and thus, NIR is not a particularly useful IR fingerprinting region for ACC. In contrast, mid-IR and far-IR regions offer promising diagnostic spectral features that we test below to detect ACC in cyanobacteria.

3.2. FTIR spectra of ACC+ and ACC- cyanobacteria in the mid-IR and far-IR ranges

Several absorption bands were identified in the mid-IR spectra of *Cyanospora* PCC 7425 (ACC+) (Fig. 2). The spectral band assignment for the ACC+ and ACC- strains was achieved based on a comparison and cross-referencing against existing FTIR literature about

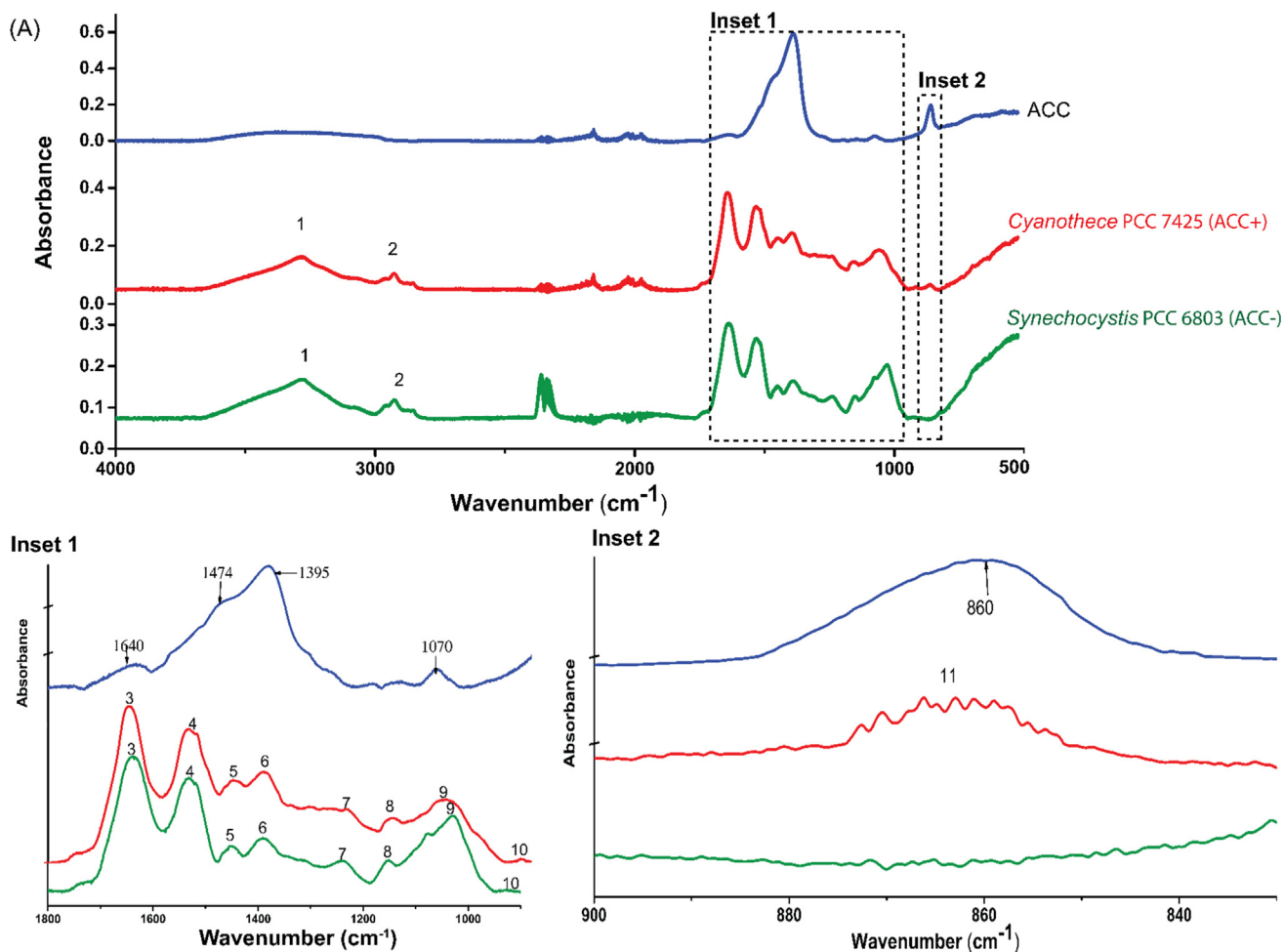


Fig. 2. (A) ATR-FTIR spectra of the *Cyanothecce* PCC 7425 (ACC+), *Synechocystis* PCC 6803(ACC-), and synthetic ACC. The bands between 2500 and 2000 cm^{-1} in the spectra are due to ambient CO_2 and H_2O resulting from insufficient purging of the sample chamber. The dashed rectangle envelops the zoomed regions of mid-IR ACC spectra shown in the inset 1 (1800–900 cm^{-1}) and inset 2 (900–820 cm^{-1}). Numbers on the spectra correspond to the band# in Table 2.

Table 2

Wavenumbers and band assignment for characteristics vibrations found in the mid IR spectra of *Cyanothecce* PCC 7425 and *Synechocystis* PCC 6803. The band assignment was primarily based on the [50,51,54].

Band Index	Wavenumbers (cm^{-1})	Main functional group
1	3279	water
2	2960–2856	methyl and methylene group vibrations from lipids and fatty acids
3	1641	amide I from proteins
4	1528	amide II from proteins
5	1444	methyl groups of lipids and C-O group in carboxylic acids
6	1391	methyl groups of lipids and C-O group in carboxylic acids
7	1241	Nucleic acids, phosphoryl group
8	1153	P = O group of nucleic acids and/or polyphosphates and C-O vibrations from polysaccharides
9	1058–1029	P = O group of nucleic acids and/or polyphosphates and C-O vibrations from polysaccharides
10	919	P = O group of nucleic acids and/or polyphosphates and C-O vibrations from polysaccharides
11	860	out-of-plane bending of carbonates in ACC (ν_2)

photrophic microorganisms ([41,50–53]) and is summarized in Table 2. Bands [1–10] were present in both *Cyanothecce* PCC 7425 and *Synechocystis* PCC 6803 and were attributed to non-ACC components. These components included O-H vibrations derived from water (band 1), methyl and methylene group vibrations from lipids and fatty acids (band 2), amide I and amide II from proteins (bands 3,4), asymmetric bending of methyl groups of lipids, and symmetric stretching from C-O group in carboxylic acids (bands 5,6), a combination of asymmetric stretching from P = O group of nucleic acids and/or polyphosphates and C-O stretching vibrations from polysaccharides (bands 7, 8, 9, 10) [50,51,54]. The bands between 2500 and 2000 cm^{-1} are due to ambient CO_2 and insufficient purging of the sample chamber. *Cyanothecce* PCC 7425 had an additional absorption band present at $\sim 860 \text{ cm}^{-1}$ (band 11) which was absent in *Synechocystis* PCC 6803. The peak position of band 11 coincides with the ACC peak at 860 cm^{-1} (Fig. 2). Moreover, the FWHM of the fitted peak at 860 cm^{-1} in *Cyanothecce* PCC 7425 was 25.1 cm^{-1} , matching that of the 860 cm^{-1} peak of ACC. No absorption band was found around $\sim 700 \text{ cm}^{-1}$ region in *Cyanothecce* PCC 7425 suggesting the absence of crystalline carbonate polymorphs. This is consistent with the under-saturation of the BG-11 growth medium with respect to carbonate phases, which does not allow the precipitation of extracellular crystalline carbonates in the growth solution (Fig. S3). Spectral features of ACC apart from the 860 cm^{-1} , namely $3600\text{--}2700 \text{ cm}^{-1}$ (O-H stretching),

1650 cm^{-1} (O-H bending), 1470–1420 cm^{-1} (ν_3) and 1084 cm^{-1} (ν_1) had strong interference with the lipids and water bands (1, 2), protein bands (3, 4), carboxylic acids bands (5,6) and nucleic acid or phosphorylated polysaccharides (7,8,9) as shown in Fig. 2B.

In the NIR region, the spectra of *Cyanothece* PCC 7425 and *Synechocystis* PCC 6803 looked almost identical, which is not surprising based on the lack of ACC features in the NIR region due to superimposition with structural water (Fig. S4). The different peaks found in the NIR spectra of cyanobacteria were primarily attributed to lipids, proteins, and water (Fig. S5) in accordance to Vaidyanathan et al. [55].

In the FIR region, broad features around 150 cm^{-1} were observed in both ACC+ and ACC- cyanobacteria strains, possibly corresponding to torsional frequencies of primary amines [56,57]. Interestingly, FIR spectra of *Cyanothece* PCC 7425 showed a broad but strong peak around $\sim 320 \text{ cm}^{-1}$, which was absent in *Synechocystis* PCC 6803 (Fig. 3). The asymmetric line shape is characteristic for samples prepared with PE as filling material, and it is not found in the spectra of samples prepared without PE [58]. The position of this peak coincides with the broad peak observed in FIR spectra of synthetic ACC (Fig. 1), suggesting that the peak might be due to ACC in *Cyanothece* PCC 7425.

Comparing the mid-IR and far-IR spectra of ACC+ and ACC- cyanobacteria strains, only the ν_2 band at 860 cm^{-1} and the broad peak at $\sim 306 \text{ cm}^{-1}$ (characteristic vibrations of ACC) are free from overlaps with spectral features attributed to organics. Consistently, they are present in ACC + cyanobacteria, while absent in ACC- cyanobacteria. Indeed, ACC features in spectral region $> 900 \text{ cm}^{-1}$ are masked by vibrations from organics, suggesting that spectral features of ACC in the spectral region $> 900 \text{ cm}^{-1}$ are not reliable diagnostic indicator of presence of ACC in a sample dominated by organics. Such complex combination between ACC bands and organic bands is shown to be absent in organic-poor eukaryotic ACC, where the intense vibrational bands from ACC mask the bands from the matrix biomolecules, making the ACC mid-IR bands in regions $> 900 \text{ cm}^{-1}$ detectable [59]. Based on these results, we argue that the use of spectral features of ACC in region $> 900 \text{ cm}^{-1}$ to confirm ACC in an organic-rich matrix could result in some misleading results. For instance, Enyedi et al. used the presence of bands at 1494 cm^{-1} and at 1066 cm^{-1} in an organic-rich bacterial extra-polymer-substance (EPS) to infer the

presence of ACC in bacterial EPS [38]. Fortunately, this interpretation was further supported by other complementary techniques (electron diffraction and Raman spectroscopy). However, we note that the interpretation of the FTIR data by Enyedi et al. is not accurate, since the characteristic peaks of ACC at 1494 cm^{-1} and at 1066 cm^{-1} could be attributed to the vibrations from organic components present in the samples, such as proteins, nucleic acid, and phosphorylated polysaccharides.

Whether these spectral features apply to a broader diversity of prokaryotes remains an open question. The characteristic peaks of major biomolecules (e.g., proteins, polysaccharides) can be expected to remain the same across different prokaryotic taxa, but some minor differences have been reported due to solution chemistry, growth conditions and taxonomy [41,60–62]. In the next section, we assess the effect of physiological differences on the above-identified ACC spectral features by surveying different cyanobacterial strains affiliated to the same *Microcystis* genus.

3.3. Case study: Examining the capability of *Microcystis* strains to form ACC using FTIR spectroscopy and SEM

The cyanobacterial genus *Microcystis* has been intensely (e.g. [63–66]) studied because it comprises some strains producing hepato- and neuro-toxins, and blooming mostly in freshwater and brackish water, causing significant environmental issues.

While ACC formation has been evidenced in a broad diversity of cyanobacteria [10], *Microcystis* has so far been poorly studied in this perspective. Here, we acquired FTIR spectra of several different *Microcystis* strains in the mid-IR region to investigate if some of them may form ACC (Fig. 4). Characteristic bands of proteins, lipids, polysaccharides, and phosphate groups (bands 1–10) were observed in the 4000–900 cm^{-1} spectral region in all *Microcystis* strains, similarly to what was observed in *Cyanothece* PCC 7425 and *Synechocystis* PCC 6803 (Fig. 4A). The band location and assignment were in good agreement with the previously reported bands in *Microcystis* in the 4000–1000 cm^{-1} frequency range [41]. Visual inspection of *Microcystis* strains in the 950–800 cm^{-1} region reveals that all *Microcystis* spectra had a clearly defined band at $\sim 918 \text{ cm}^{-1}$, labeled as band 10 in Fig. 4C. Additionally, a broad peak at $\sim 880 \text{ cm}^{-1}$ was clearly observed in *Microcystis* PMC 569, PMC 810, PMC 824, and PMC 828, while this band appeared visually as an asymmetric broad band for the other *Microcystis* strains (PMC 814, PMC 820, PMC 827 and PMC 831) (Fig. 4C). A sharp peak at $\sim 855 \text{ cm}^{-1}$ was observed in *Microcystis* PMC 824 only. In *Microcystis* PMC 820, PMC 827 and PMC 831, a band close to 860 cm^{-1} was observed. Unlike what was observed for *Cyanothece* PCC 7425, this band, possibly affiliated to the 860 cm^{-1} peak of ACC, was not well-defined and overlapped with other neighboring peaks in the 950–800 cm^{-1} spectral range (Fig. 4B).

To overcome the challenge of overlapping bands, we fitted the experimental spectra of all *Microcystis* strains in the 950–800 cm^{-1} frequency range with a combination of four (Voigt) peak components: fit peak 1 at $\sim 918 \text{ cm}^{-1}$ and fit peak 2 at $\sim 880 \text{ cm}^{-1}$, fit peak 3 at $\sim 860 \text{ cm}^{-1}$, and fit peak 4 at $\sim 855 \text{ cm}^{-1}$. Fig. 5 shows the best fits for different *Microcystis* strains, and the peak properties are listed in Table 3. The fit quality parameters are listed in Table S2. Based on the curve fit, we find that fit peak 1 at $\sim 918 \text{ cm}^{-1}$ and fit peak 2 at $\sim 880 \text{ cm}^{-1}$ were present in all *Microcystis* strains (Table 3). The fit peak 1 at $\sim 918 \text{ cm}^{-1}$ was also present in *Synechocystis* PCC 6803 and *Cyanothece* PCC 7425 (peak labeled 10 in Fig. 2 and Fig. 4) and is attributed to a combination of asymmetric stretching from the P = O group of nucleic acids and/or polyphosphates and C-O stretching vibrations from polysaccharides. Intra-strain variations in the intensity of fit peak 1 at $\sim 918 \text{ cm}^{-1}$ could potentially be due to variations in the polyphosphate and polysaccharide content of the cells. Polyphos-

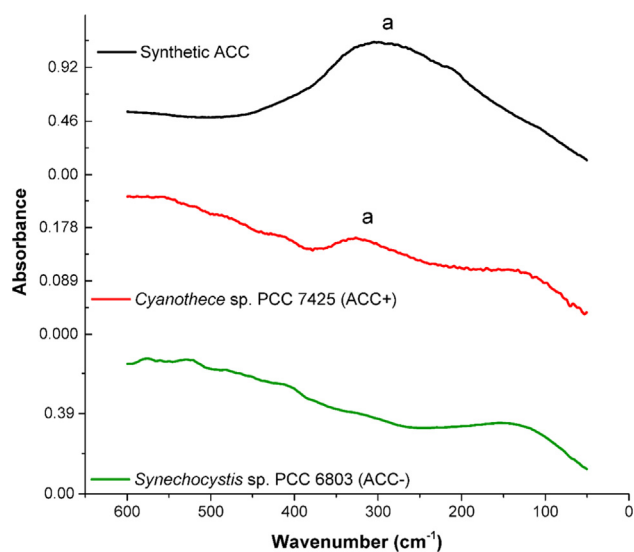


Fig. 3. FIR spectra of the ACC+ and ACC- cyanobacteria. The peak labeled marked as “a” denotes the location of the characteristic features of ACC in FIR at $\sim 306 \text{ cm}^{-1}$. This peak was at $\sim 320 \text{ cm}^{-1}$ in *Cyanothece* PCC 7425 (ACC +).

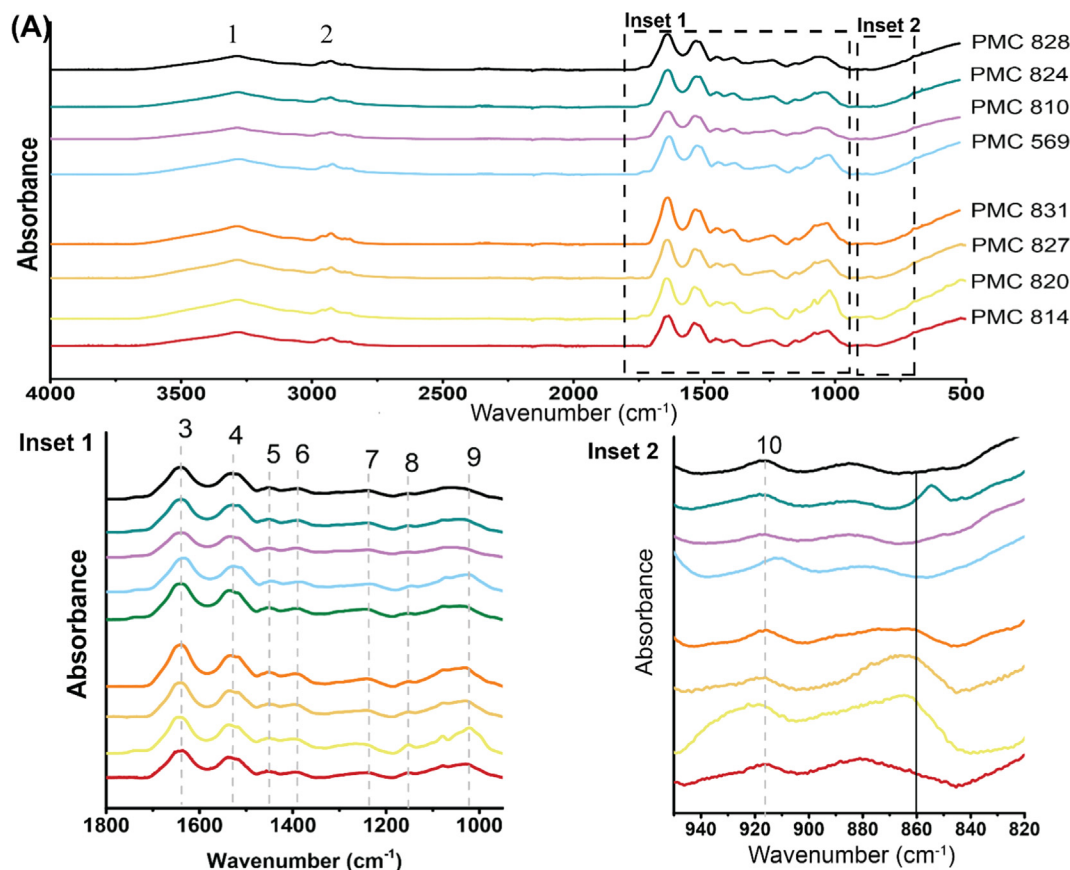


Fig. 4. (A) ATR-FTIR spectra of PMC *Microcystis* sp. strains in the mid IR range. The dashed rectangle envelops the zoomed regions of mid-IR ACC spectra shown in the inset 1 (1800–900 cm^{-1}) and inset 2 (950–820 cm^{-1}). Numbers on the spectra correspond to the band numbers and their assignment are provided in Table 1. The vertical gray dash lines in Inset 1 are guidelines to facilitate identification of the position of bands (1–10) in the different PMC *Microcystis* sp. strains. The solid black line in Inset 2 denotes the location of characteristic ν_2 band of ACC ($\sim 860 \text{ cm}^{-1}$).

phates and polysaccharides serve as carbon, phosphorus and energy reserves, and their content is known to vary during the growth of the cyanobacteria [41,52]. The fit peak 2 at $\sim 880 \text{ cm}^{-1}$ could match with vibrations of crystalline carbonates. However, no peak at $\sim 714 \text{ cm}^{-1}$ was found suggesting the absence of such phases. Alternatively, fit peak 2 may be assigned to bicarbonate [67]. Cyanobacteria are known to accumulate high amount of intracellular bicarbonate owing to carbon concentrating mechanisms [68]. The bicarbonate band is generally weak and sensitive to the degree of hydration of bicarbonate ions, i.e. the band is red shifted and becomes broader with increasing hydration [69]. Unfortunately, it is not possible to further confirm this band assignment based on other bands characteristic of bicarbonate since they overlap with carbonate vibrations and/or are masked by vibrations of biomolecules. A third possible affiliation of fit peak 2 can be made as strong = C-H out-of-the plane bending vibrations of alkenes [54]. The other peaks characteristics of alkenes are stretching = C-H vibrations at 3100–3000 cm^{-1} and C = C stretching vibrations at 1660–1500 cm^{-1} , both of which overlap with band #1 (attributed to water) and band #3, #4 (attributed to proteins) in all *Microcystis* strains [70]. Alkenes typically form part of the structure of fatty acids, and/or carotenoid pigments (commonly present in photosynthetic cells and one of the main components of the phytoaccumulation complex [70,71]). Last, fit peak 2 at $\sim 880 \text{ cm}^{-1}$ could be due to the P = O group vibrations of polyphosphates as proposed by Wang et al. [72]. This assignment is also consistent with the presence of other characteristic bands (bands 7, 8, 9, 10) of polyphosphates observed in all the *Microcystis* strains (Table 2). As a summary, fit peak 2 may result from vibra-

tions in bicarbonates, alkenes and/or polyphosphates. Interestingly, fit peak 4 at 855 cm^{-1} was only found in *Microcystis* PMC 824 and had a relatively narrow FWHM (8 cm^{-1}) in comparison to the 860 cm^{-1} (ν_2) band of ACC (FWHM = 25 cm^{-1}) suggesting that the band at 855 cm^{-1} is not linked to the 860 cm^{-1} band of ACC. Nitrates and chloride salts, contained by the BG-11 growth medium are known to give rise to a sharp peak at $\sim 855 \text{ cm}^{-1}$ [73]. Thus, the band at $\sim 855 \text{ cm}^{-1}$ could be assigned to nitrate salts from the growth medium and may result from in-sufficient rinsing of the *Microcystis* PMC 824 cell suspension.

Last, peak fit of the *Microcystis* spectra revealed that fit peak 3 at 860 cm^{-1} was only present in strains PMC 814, PMC 820, PMC 827, and PMC 831 (Fig. 5 and Table 3). The overall quality of the fit for these strains was poorer when fit peak 3 was not included in the fit components (Fig. S5 and Table S2). The FWHM of fit peak 3 at 860 cm^{-1} in *Microcystis* strains was slightly narrower ($\sim 21 \text{ cm}^{-1}$) but still comparable with the 860 cm^{-1} band of synthetic ACC (25 cm^{-1}) (Table 3). By contrast, poor fit quality was obtained upon fitting a band at 860 cm^{-1} in the experimental spectra of the PMC 824, PMC 569, PMC 810, and PMC 828 strains, suggesting that the band at 860 cm^{-1} was not present in these spectra (Fig. S5 and Table S2). Thus, based on the presence/absence of the 860 cm^{-1} band in *Microcystis* strains, we were able to screen four (PMC 814, PMC 820, PMC 827 and PMC 831) out of eight strains as promising candidates to possess ACC-forming capabilities. These findings were further reinforced by analyzing the FIR region spectra of *Microcystis* strains. We compared the FIR spectra of two *Microcystis* strains: *Microcystis* PMC 827 and *Microcystis* PMC 824. We found broad features around 150 cm^{-1} in both PMC 827 and PMC 824

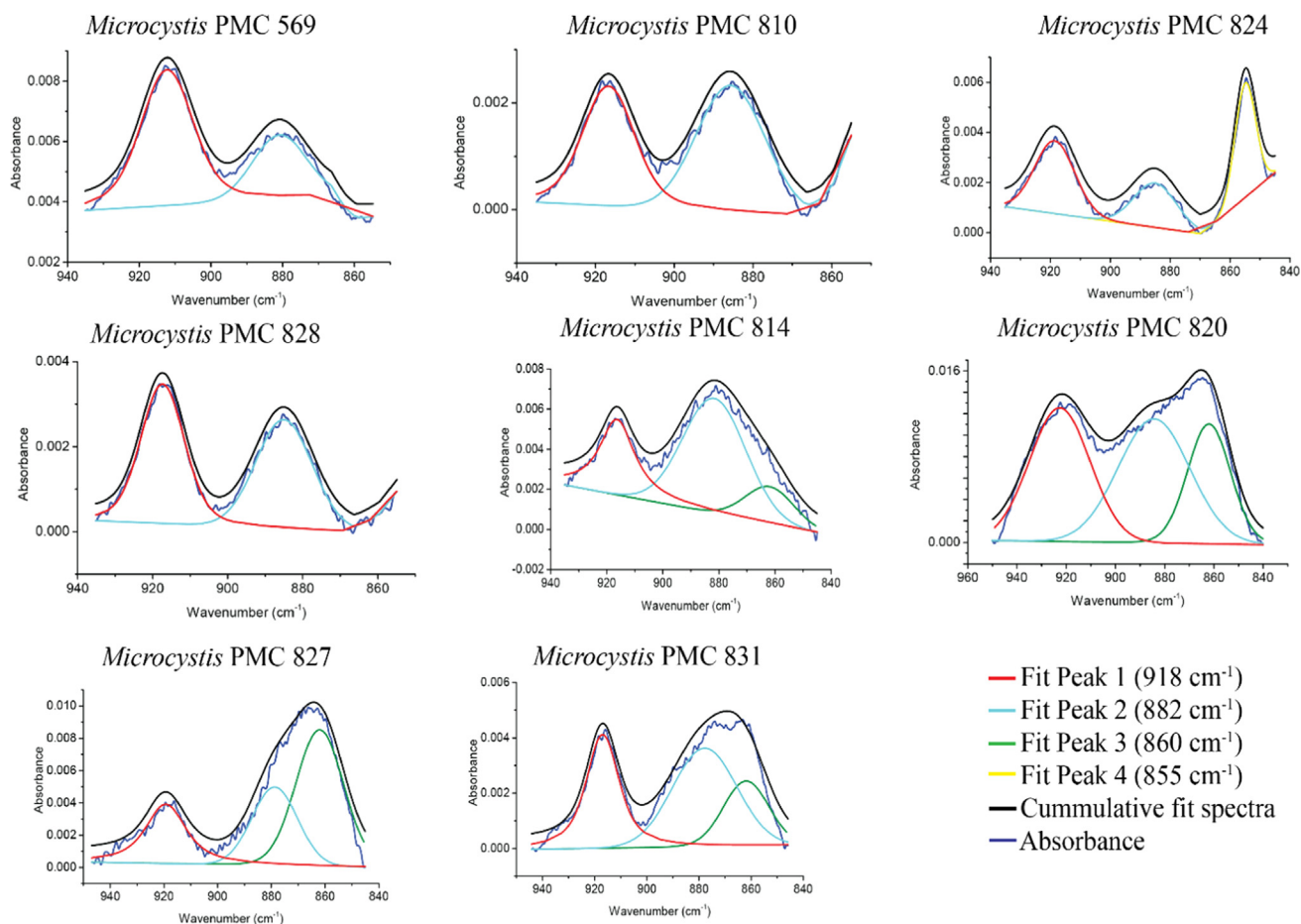


Fig. 5. Peak fit of *Microcystis* strains in the frequency region 940–840 cm^{-1} . For strains PMC 569, PMC 810 and PMC 828, best fit was achieved by using 2 band components ($\sim 918 \text{ cm}^{-1}$, 882 cm^{-1}); for PMC 824, best fit was achieved by using 3 band components (918 cm^{-1} , 882 cm^{-1} and 855 cm^{-1}); for strains PMC 814, 820 and 831, 3 band components (918 cm^{-1} , 882 cm^{-1} and 860 cm^{-1}) yielded best fit. The peak positions of the fitted bands are noted in table 3 and fit quality summarized in the table S2.

Table 3

Peak spectral properties of the fitted peaks in *Microcystis* strains corresponding to the best fit for each strain.

	Fitted Peak Centers (cm^{-1})				FWHM (cm^{-1})			
	Peak 1*	Peak 2	Peak 3**	Peak 4	Peak 1	Peak 2	Peak 3 [†]	Peak 4
<i>Microcystis</i> PMC 569	912 [†]	881 ± 0.09	™	NA	18 ± 0.19	17 ± 0.11	™	™
<i>Microcystis</i> PMC 810	917 [†]	886 ± 0.06	™	NA	16 ± 0.16	20 ± 0.73	™	™
<i>Microcystis</i> PMC 824	919 [†]	885 ± 0.1	™	855 ± 0.03	16 ± 0.15	17 ± 0.22	™	8 ± 0.06
<i>Microcystis</i> PMC 828	917 [†]	885 ± 0.04	™	™	14 ± 0.08	18 ± 0.09	™	™
<i>Microcystis</i> PMC 814	916 [†]	882 ± 0.71	862 ± 1.77	™	15 ± 0.82	26 ± 1.14	21 ± 1.19	™
<i>Microcystis</i> PMC 820	923 [†]	884 ± 1.19	862 ± 0.3	™	29 ± 1.14	34 ± 4.4	21 ± 1.45	™
<i>Microcystis</i> PMC 827	919 [†]	879 ± 3.07	862 ± 1.8	™	18 ± 0.61	20 ± 4.27	21 ± 0.92	™
<i>Microcystis</i> PMC 831	917 [†]	878 ± 5.88	862 ± 2.6	™	15 ± 0.91	29 ± 8.4	21 ± 1.78	™

*This fit band is same as band 10 in table 1
[†] This parameter was fixed
^{**} Peak 3 center was constrained to vary between $861 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$
^{††} The gaussian FWHM of peak 3 was set to be at least 20 cm^{-1}
[™] No peak fit at this location.

strains, similar to that observed in ACC+ and ACC- cyanobacterial strains and possibly corresponding to torsional frequencies of primary amines[56,57]. FIR spectra of *Microcystis* PMC 827 showed a broad but strong peak around $\sim 320 \text{ cm}^{-1}$, which was absent in *Microcystis* PMC 824 (Fig. 6). The position of this peak coincides with the broad peak observed in FIR spectra of synthetic ACC as well as in ACC+ forming cyanobacteria strain (Fig. 3), confirming the presence of ACC in *Microcystis* PMC 827 and its absence in PMC 824. This is consistent with observations on the ACC-forming potential of these strains derived from the mid-IR spectra of these strains.

To further confirm our findings on the capability of *Microcystis* strains to form ACC, we analyzed all the *Microcystis* strains by SEM-EDXS (Fig. 7 and Fig. S6). For each strain, several cell aggregates were randomly selected, and EDXS maps were obtained. Each cell had a variable number of inclusions, ranging from zero to a hundred. Based on EDXS elemental mapping, all *Microcystis* strains contained inclusions enriched in P, containing Mg, K, and Ca were interpreted as polyphosphate (polyP) granules. Several functions of polyP inclusions have been inferred in bacteria, including the provision of an alternative source of energy under some specific environmental conditions[10]. Observation of polyP inclusions is

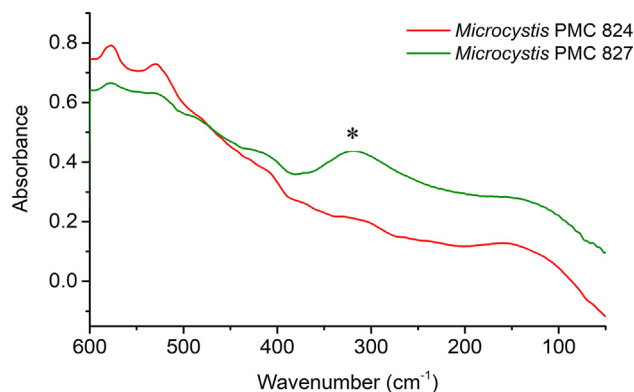


Fig. 6. FIR spectra of *Microcystis* PMC 827 and *Microcystis* PMC 824. The peak labeled marked as "*" denotes the characteristic features of ACC in FIR at $\sim 300\text{--}320\text{ cm}^{-1}$.

consistent with the presence of polyP IR bands [8–10] in all *Microcystis* strains [Table 2, Fig. 4]. Qualitatively, the number of polyP inclusions vary among different *Microcystis* strains as observed in SEM micrographs, which suggests that the amount of polyP content varies across *Microcystis* strains (Fig. 6 and Fig. S6). The variation in polyP content across *Microcystis* strains is also reflected in the differences observed in peak height of the polyP bands

[8–10] present in *Microcystis* strains (Fig. 4). In contrast to polyP inclusions, inclusions enriched in Ca with little or no P were interpreted as ACC. They were only found in strains PMC 814, 820, 827, and 831, which was perfectly consistent with FTIR results. Altogether, based on the presence/absence of the mid-IR ν_2 absorption band at 860 cm^{-1} and a broad band at $\sim 300\text{ cm}^{-1}$ in FIR region, both characteristics of ACC, and using SEM-EDXS as a supporting tool, we identify four out of eight *Microcystis* strains that are able to form ACC, whereas the rest of the *Microcystis* strains do not form ACC, at least not in sufficient amount to be detected by FTIR spectroscopy and/or under the growth conditions that were used in the present study.

Semi-quantitative estimation of ACC in *Microcystis*.

The relative intensity of FTIR spectral bands such as proteins, silicate, lipids have frequently been used to correlate the chemically measured content of cellular biomolecules [74,75]. In this study, the intensity of the 860 cm^{-1} band is used to compare the variation in ACC content in *Microcystis* strains identified as ACC + strains. To do so, we first measured a calibration curve to assess the relationship between ACC wt % in a physical mixture of *Synechocystis* PCC 6803 (ACC-) + synthetic ACC and the normalized 860 cm^{-1} band area. Mid-IR spectra of different *Synechocystis* PCC 6803 + synthetic ACC mixtures are shown in Fig. 8A. The higher the ACC wt % in the mixtures, the lower the contribution of the organics to the characteristic ACC bands at $1474\text{ (}\nu_3\text{)}$, $1070\text{ (}\nu_1\text{)}$, and $1640\text{ (O-H bending)}$ was observed (Fig. 8B). An increase

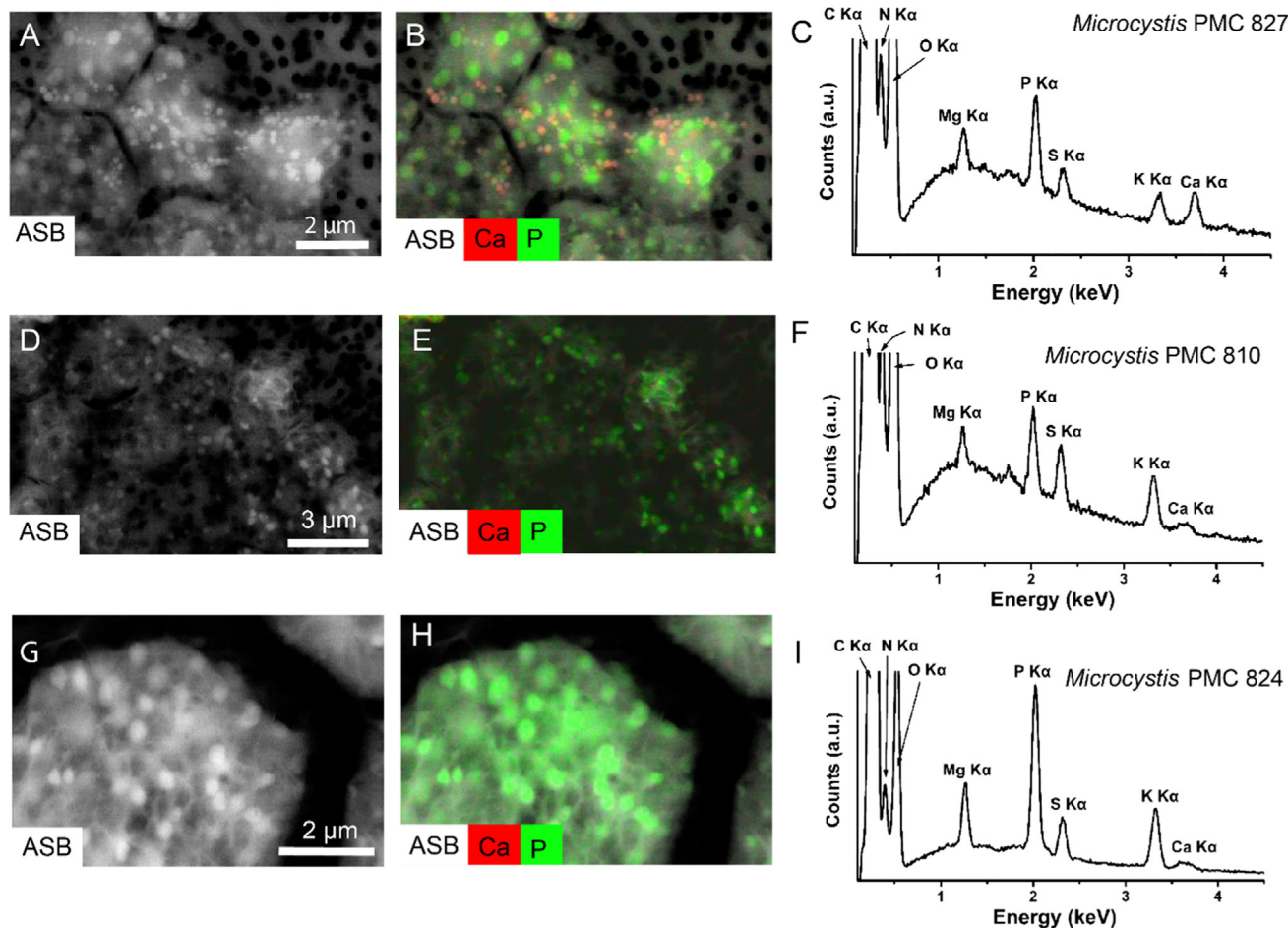


Fig. 7. Representative SEM images of *Microcystis* strains found to be capable of forming ACC and not forming ACC based on FTIR. (A, D, G) SEM image of the *Microcystis* PMC 827 (ACC+), *Microcystis* PMC 810 (ACC-), *Microcystis* PMC 824 (ACC-) strains in AsB detection mode, respectively. (B, E, H) Corresponding overlay of AsB image with EDXS maps of Ca (red) and P (green) for *Microcystis* PMC 827 (ACC+), *Microcystis* PMC 810 (ACC-), *Microcystis* PMC 824 (ACC-) respectively. (C, F, I) SEM-EDXS spectra of *Microcystis* sp. PMC 827 (ACC+), *Microcystis* PMC 810 (ACC-), *Microcystis* PMC 824 (ACC-) respectively.

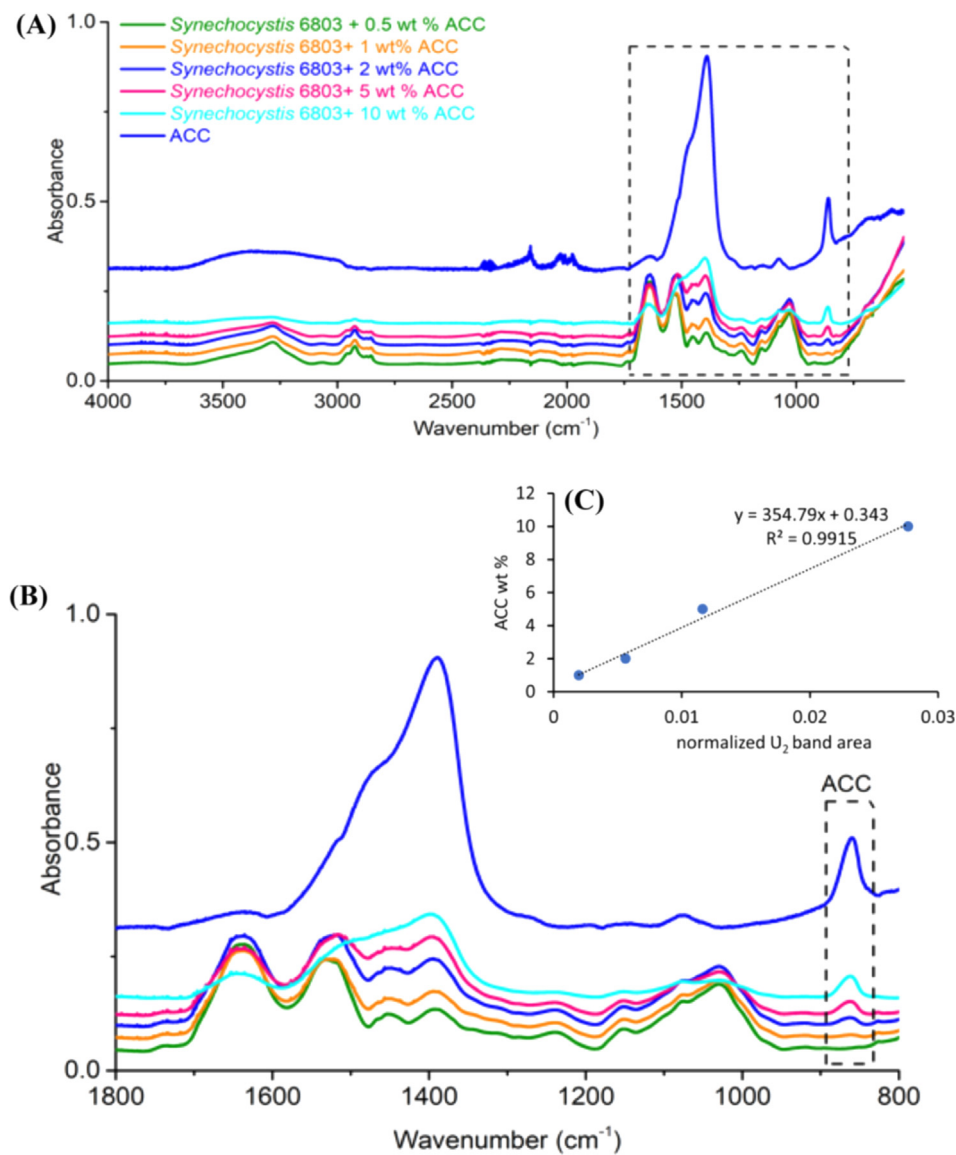


Fig. 8. (A) ATR-FTIR spectra of *Synechocystis* PCC 6803-ACC mixtures. (B) Zoomed plot of the boxed region in (A). The peak intensity of v₂ band of ACC was normalized by the frequency region marked by dashed rectangle in (A). (C) The FTIR calibration curve of normalized peak area of v₂ band for different *Synechocystis* PCC 6803-ACC mixtures.

of the ACC content in the mixtures correlated with an increase of the 860 cm⁻¹ band (Fig. 8B). To correct for possible variations in the path length (thickness of individual cyanobacterial mixture), and water content, all spectra were area-normalized. In the literature, the integrated area under the amide I/II band has been used for normalizing diverse peak areas of interest [76]. However, for the different mixtures of the present study, the relative absorption was not constant for both amide I and II bands (Fig. 8B). Moreover, amide bands suffer from interferences with vibrations associated with ACC structural water (O-H bending at 1650 cm⁻¹) and the v₃ band of ACC at 1474 cm⁻¹ (Fig. 8B). Therefore, in our study, it was more appropriate to use the integrated area between 1800 and 832 cm⁻¹ frequencies, to normalize the area under the 860 cm⁻¹ band (between 880 and 832 cm⁻¹). The computed changes in the normalized area of the peak at 860 cm⁻¹ are plotted against the ACC wt % in the mixtures (Fig. 8C). A strong linear correlation is found between the normalized area of the 860 cm⁻¹ band and the amount of ACC present in the *Synechocystis* PCC 6803 + ACC mixtures. We applied this relationship to estimate the ACC content in ACC+ *Microcystis* strains. As shown in Table 4,

Table 4

The calculated ACC (wt %) content in 4 *Microcystis* strains, using the calibration curve equations determined on artificial *Synechocystis* PCC 6803-ACC mixtures.

Strain	Normalized v ₂ band area	Calculated ACC (wt%)	Derived ACC content*
PMC 814	4.00E-04	0.48	0.91
PMC 820	8.00E-03	3.18	4.23
PMC 827	2.38E-03	1.19	3.92
PMC 831	7.20E-04	0.60	

*Derived based on the assumption that the total Ca concentration measured on ICP-OES in the sample constitutes ACC reservoir.

the “calculated ACC” content in ACC+ *Microcystis* strains varied between 0.5 and 3% wt ACC (Table 3). This calculated ACC content was compared with the ACC content estimated from the measured total Ca concentration in the dried biomass, referred to as the “derived ACC content” in Table 4. Although the estimated absolute value of derived and calculated ACC content in strains were different, the trends were similar, that is *Microcystis* PMC 820 had the highest ACC content, followed by *Microcystis* PMC 827. Similar

variations in the ACC content of diverse strains have been observed before. For the known ACC+ cyanobacteria strains, the maximum amount of ACC content can vary from 2 to 8 wt% [11]. Reasons for such variations in the ACC content are not clear and will need to be further assessed by future studies. It could be linked with the varying physiological state of the cells, or a different function of ACC in these strains [10,11].

4. Conclusions

This study probed intact cells of cyanobacteria forming intracellular ACC inclusions using FTIR spectroscopy, to identify diagnostic IR spectral features of ACC that are suitable for its detection in systems dominated by prokaryotes. ACC has several IR active bands that have been widely used to discriminate ACC from other CaCO₃ polymorphs. While several of these bands were found to overlap with characteristic bands of proteins, lipids, polysaccharides, and phosphate groups, two ACC characteristic bands at 860 cm⁻¹ and a broad peak at ~ 306 cm⁻¹ were free from any overlap from biomolecules. Moreover, the bands at 860 cm⁻¹ and a broad peak at ~ 306 cm⁻¹ were systematically present only in ACC+ cyanobacteria and absent in ACC- cyanobacteria, suggesting that both bands could serve as a spectral marker to screen strains for their capability of forming ACC. The reliability of these diagnostic features of ACC was tested on several *Microcystis* strains whose ACC-forming capabilities were unknown. Using mid-IR and far-IR ACC spectral features, we identified four out of eight *Microcystis* strains as ACC forming strains. These findings were confirmed by SEM-EDXS observations. Lastly, we quantified the ACC content of *Microcystis* strains using the variations in 860 cm⁻¹ band intensity. While the semi-quantification approach used here is an approximation, it provides some insights into assessing the Ca accumulation potential of the ACC-forming *Microcystis* strains and other prokaryotes and their relevance as a geochemical reservoir of Ca in the environment. Overall, FTIR spectroscopy in the mid-IR and far-IR range appear as a very valuable and reliable tool to diagnose the presence of ACC in bacteria and screen efficiently numerous samples before using more time-consuming techniques such as electron microscopy. Whether these spectral features are effective in detecting ACC-forming prokaryotes in a complex environmental sample composed of different microbial populations as well as extracellular minerals remains an interesting topic for future research.

Credit author statement

Neha Mehta: funding acquisition, conceptualization, formal analysis, investigation, writing-original draft; Juliette Gaëtan: investigation, formal analysis, writing-original draft; Paola Giura: methodology, writing-review and editing; Thierry Azaïs: writing-review and editing, funding acquisition, Karim Benzerara: conceptualization, writing-review and editing, funding acquisition, supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We would like to thank the financial support from the Institut de science des matériaux (IMat), Sorbonne University and the French Agence Nationale de la Recherche (ANR), under grant

ANR-18-CE0-0013-02. We would also like to thank several instrumentation facilities located at L'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC, Paris, France) that enabled streamlines measurement and analysis of datasets presented in this work: Maxime Guillaumet and Keevin Béneut for Spectroscopy platform; Imène Esteve, Stéphanie Delbrel and Béatrice Doisneau for SEM support; Ludovic Delbes and Benoît Baptiste for X-ray diffraction facility; and Cynthia Travert and Feriel Skouri-Panet for GEMME (geomicrobiology) facility. We thank Laure Cordier at Institut de Physique du Globe de Paris (IPGP, Paris, France) for ICP-OES analysis. We thank Pierre Beck at Université Grenoble-Alpes (France) for near-IR analysis and Xavier Carrier from Laboratoire de Réactivité de Surface (Sorbonne University, Paris, France) for TGA-MS analysis. We thank Cécile Bernard and Charlotte Duval from the Paris Museum collection (PMC) for providing PMC strains. Lastly, we thank the two anonymous reviewers for their constructive feedbacks.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121262>.

References

- [1] B.L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, Taking Advantage of Disorder : Amorphous Calcium Carbonate and Its Roles in Biomineralization, *Adv. Mater.* 12 (2003) 959–970.
- [2] I.M. Weiss, N. Turoso, L. Addadi, S. Weiner, Mollusc Larval Shell Formation: Amorphous Calcium Carbonate Is a Precursor Phase for Aragonite, *J. Exp. Zool.* 293 (5) (2002) 478–491.
- [3] Y. Politi, R.A. Metzler, M. Abrecht, B. Gilbert, F.H. Wilt, I. Sagi, L. Addadi, S. Weiner, P.U.P.A. Gilbert, Transformation Mechanism of Amorphous Calcium, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (45) (2008) 17362–17366.
- [4] Y. Politi, Y. Levi-Kalishman, S. Raz, F. Wilt, L. Addadi, S. Weiner, I. Sagi, Structural Characterization of the Transient Amorphous Calcium Carbonate Precursor Phase in Sea Urchin Embryos, *Adv. Funct. Mater.* 16 (10) (2006) 1289–1298.
- [5] Y. Politi, T. Arad, E. Klein, S. Weiner, L. Addadi, Sea Urchin Spine Calcite Forms via a Transient Amorphous Calcium Carbonate Phase, *Science*. 306 (5699) (2004) 1161–1164.
- [6] J. Aizenberg, G. Lambert, S. Weiner, L. Addadi, Factors Involved in the Formation of Amorphous and Crystalline Calcium Carbonate: A Study of an Ascidian Skeleton, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (1) (2002) 32–39.
- [7] V. Salman, T. Yang, T. Berben, F. Klein, E. Angert, A. Teske, Calcite-accumulating large sulfur bacteria of the genus *Achromatium* in Sippewissett Salt Marsh, *Calcite-Accumulating Large Sulfur Bacteria of the Genus Achromatium in Sippewissett Salt Marsh*. 9 (11) (2015) 2503–2514.
- [8] Monteil, C. L.; Benzerara, K.; Menguy, N.; Bidaud, C. C.; Michot-Achdjian, E.; Bolzoni, R.; Mathon, F. P.; Coutaud, M.; Alonso, B.; Garau, C.; et al. Intracellular Amorphous Ca-Carbonate and Magnetite Biomineralization by a Magnetotactic Bacterium Affiliated to the Alphaproteobacteria. *ISME J.* 2021, 15 (1).
- [9] E. Couradeau, K. Benzerara, E. Gérard, D. Moreira, S. Bernard, G.E.J. Brown, P. López-García, An Early-Branching Microbialite Cyanobacterium Forms Intracellular Carbonates, *Sci* 336 (2012) 459–462.
- [10] K. Benzerara, F. Skouri-Panet, J. Li, C. Ferard, M. Gugger, T. Laurent, E. Couradeau, M. Ragon, J. Cosmidis, N. Menguy, et al., Intracellular Ca-Carbonate Biomineralization Is Widespread in Cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (30) (2014) 10933–10938.
- [11] A. De Wever, K. Benzerara, M. Gugger, M. Coutaud, G. Caumes, M. Poinot, F. Skouri-Panet, T. Laurent, E. Duprat, M. Gugger, Evidence of High Ca Uptake by Cyanobacteria Forming Intracellular CaCO₃ and Impact on Their Growth, *Geobiology* 17 (6) (2019) 1–15.
- [12] J. Cosmidis, K. Benzerara, Why Do Microbes Make Minerals ?, *Comptes Rendus Géoscience Planète* 354 (G1) (2022) 1–39
- [13] N. Mehta, K. Benzerara, B.D. Kocar, V. Chapon, Sequestration of Radionuclides Radium-226 and Strontium-90 by Cyanobacteria Forming Intracellular Calcium Carbonates, *Environ. Sci. Technol.* 53 (21) (2019) 12639–12647.
- [14] J.A. Bradley, L.K. Daille, C.B. Trivedi, C.L. Bojanowski, B.W. Stamps, B.S. Stevenson, H.S. Nunn, H.A. Johnson, S.J. Loyd, W.M. Berelson, F.A. Corsetti, J. R. Spear, Carbonate-rich dendrolitic cones: insights into a modern analog for incipient microbialite formation, Little Hot Creek, Long Valley Caldera, California, *npj Biofilms Microbiomes* 3 (1) (2017), <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0041-2>.
- [15] S. Amarouche-Yala, A. Benouadah, A. El Ouahab Bentabet, P. López-García, Morphological and Phylogenetic Diversity of Thermophilic Cyanobacteria in Algerian Hot Springs, *Extremophiles* 18 (6) (2014) 1035–1047.

- [16] Couradeau, E.; Benzerara, K.; Gérard, E.; Moreira, D.; Bernard, S.; López-García, G. E. B. J. P. An Early-Branching Microbialite Cyanobacterium Forms Intracellular Carbonates. *Science*. **2012**, *336*, 459–462.
- [17] Head, I. M.; Gray, N. D.; Howarth, R.; Pickup, R. W.; Clarke, K. J.; Jones, J. G. Achromatium Oxaliferum Understanding the Unmistakable. In *Advances in Microbial Ecology*; Schink, B., Ed.; Springer US: Boston, MA, 2000; pp 1–40.
- [18] M.E. Hodson, L.G. Benning, B. Demarchi, K.E.H. Penkman, J.D. Rodriguez-Blanco, P.F. Schofield, E.A.A. Versteegh, Biomineralisation by Earthworms - An Investigation into the Stability and Distribution of Amorphous Calcium Carbonate, *Geochem. Trans.* **16** (1) (2015), <https://doi.org/10.1186/s12932-015-0019-z>.
- [19] C.J. Stephens, S.F. Ladden, F.C. Meldrum, C.H.K. Biomineralization, Amorphous Calcium Carbonate Is Stabilized in Confinement, *Adv. Funct. Mater.* **20** (13) (2010) n/a-n/a.
- [20] E. Loste, R.M. Wilson, R. Seshadri, F.C. Meldrum, The Role of Magnesium in Stabilising Amorphous Calcium Carbonate and Controlling Calcite Morphologies, *J. Cryst. Growth* **254** (1–2) (2003) 206–218.
- [21] Z. Liu, Z. Zhang, Z. Wang, B. Jin, D. Li, J. Tao, R. Tang, J.J. de Yoreo, Shape-Preserving Amorphous-to-Crystalline Transformation of CaCO₃ Revealed by in Situ TEM, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117** (7) (2020) 3397–3404.
- [22] J. Cavanaugh, M. Whittaker, D. Joester, Crystallization Kinetics of Amorphous Calcium Carbonate in Confinement, *Chem. Sci.* **10** (19) (2019) 5039–5043.
- [23] J. Li, I. Margaret Oliver, N. Cam, T. Boudier, M. Blondeau, E. Leroy, J. Cosmidis, F. Skouri-Panet, J.-M. Guigner, C. Féraud, M. Poinsot, D. Moreira, P. Lopez-Garcia, C. Cassier-Chauvat, F. Chauvat, K. Benzerara, Biomineralization Patterns of Intracellular Carbonatogenesis in Cyanobacteria: Molecular Hypotheses, *Minerals* **6** (1) (2016) 10, <https://doi.org/10.3390/min6010010>.
- [24] K. Benzerara, R. Bolzoni, C. Monteil, O. Beyssac, O. Forni, B. Alonso, M.P. Asta, C. Lefevre, The Gammaproteobacterium Achromatium Forms Intracellular Amorphous Calcium Carbonate and Not (Crystalline) Calcite, *Geobiology* **19** (2) (2021) 199–213.
- [25] H. Elderfield, The Application of Infra-Red Absorption Spectroscopy to Carbonate Mineralogy, *J. Cryst. Growth* **9** (1967) 5–21.
- [26] N.V. Vagenas, A. Gatsouli, C.G. Kontoyannis, Quantitative Analysis of Synthetic Calcium Carbonate Polymorphs Using FT-IR Spectroscopy, *Talanta* **59** (2003) 831–836.
- [27] C.R. Blue, P.M. Dove, ScienceDirect Chemical Controls on the Magnesium Content of Amorphous Calcium Carbonate, *Geochim. Cosmochim. Acta* **148** (2015) 23–33.
- [28] F. Konrad, B. Purgstaller, F. Gallien, V. Mavromatis, P. Gane, M. Dietzel, Influence of Aqueous Mg Concentration on the Transformation of Amorphous Calcium Carbonate, *J. Cryst. Growth* **498** (April) (2018) 381–390.
- [29] E. Beniash, J. Aizenberg, L. Addadi, S. Weiner, Amorphous Calcium Carbonate Transforms into Calcite during Sea Urchin Larval Spicule Growth, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **264** (1380) (1997) 461–465.
- [30] M. Farhadi Khouzani, D.M. Chevrier, P. Güttlein, K. Hauser, P. Zhang, N. Hedin, D. Gebauer, Disordered Amorphous Calcium Carbonate from Direct Precipitation, *CrystEngComm* **17** (26) (2015) 4842–4849.
- [31] P. Bots, L.G. Benning, J.D. Rodriguez-Blanco, T. Roncal-Herrero, S. Shaw, Mechanistic Insights into the Crystallization of Amorphous Calcium Carbonate (ACC), *Cryst. Growth Des.* **12** (7) (2012) 3806–3814.
- [32] J.D. Rodriguez-Blanco, S. Shaw, L.G. Benning, The Kinetics and Mechanisms of Amorphous Calcium Carbonate (ACC) Crystallization to Calcite, via Vaterite, *Nanoscale* **3** (1) (2011) 265–271.
- [33] M.E. Hodson, L.G. Benning, C. Cinquic, B. Demarchi, M. Frogley, K.E.H. Penkman, J.D. Rodriguez-Blanco, P.F. Schofield, E.A.A. Versteegh, K. Wehbe, Synchrotron-Based Micro Fourier Transform Infrared Mapping to Investigate the Spatial Distribution of Amorphous and Crystalline Calcium Carbonate in Earthworm-Secreted Calcium Carbonate Balls, *Spectrosc. Eur.* **28** (3) (2016) 3–6.
- [34] E. Foran, S. Weiner, M. Fine, Biogenic Fish-Gut Calcium Carbonate Is a Stable Amorphous Phase in the Gilt-Head Seabream, *Sparus Aurata*. *Sci. Rep.* **3** (2013) 1–5.
- [35] L. Gago-Dupont, M.J.I. Briones, J.B. Rodríguez, B. Covelo, Amorphous Calcium Carbonate Biomineralization in the Earthworm's Calciferous Gland: Pathways to the Formation of Crystalline Phases, *J. Struct. Biol.* **162** (3) (2008) 422–435.
- [36] S. Campbell, K.M. Poduska, Incorporating Far-Infrared Data into Carbonate Mineral Analyses, *Minerals* **10** (7) (2020) 628, <https://doi.org/10.3390/min10070628>.
- [37] T. Brusentsova, R. Peale, D. Maukonen, G. Harlow, J. Bosenberg, D. Ebel, Far Infrared Spectroscopy of Carbonate Minerals, *Am. Mineral.* **2010** (95) (1967) 1515–1522.
- [38] N.T. Enyedi, J. Makk, L. Kótai, B. Berényi, S. Klébert, Z. Sebestyén, Z. Molnár, A.K. Borsodi, S. Leél-Ossy, A. Demény, et al., Cave Bacteria-Induced Amorphous Calcium Carbonate Formation, *Sci. Rep.* **10** (1) (2020) 1–12.
- [39] R. Liu, S. Huang, X. Zhang, Y. Song, G. He, Z. Wang, B. Lian, Bio-Mineralisation, Characterization, and Stability of Calcium Carbonate Containing Organic Matter, *RSC Adv.* **11** (24) (2021) 14415–14425.
- [40] A. Guido, A. Mastandrea, F. Russo, Biotic vs Abiotic Carbonates: Characterisation of the Fossil Organic Matter with Fourier-Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy, *Boll. della Soc. Paleontol. Ital.* **52** (1) (2013) 63–70.
- [41] A.P. Dean, M.C. Martin, D.C. Sigee, Resolution of Codominant Phytoplankton Species in a Eutrophic Lake Using Synchrotron-Based Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Phycologia* **46** (2) (2007) 151–159.
- [42] S. Von Eeuw, T. Azaïs, V. Manichev, G. Laurent, G. Pehau-Arnaudet, M. Rivers, N. Murali, D.J. Kelly, P.G. Falkowski, Solid-State Phase Transformation and Self-Assembly of Amorphous Nanoparticles into Higher-Order Mineral Structures, *J. Am. Chem. Soc.* **142** (29) (2020) 12811–12825.
- [43] R.Y. Stanier, J. Deruelles, R. Ripplka, M. Herdman, J.B. Waterbury, Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria, *Microbiology* **111** (1) (1979) 1–61.
- [44] S. Potin, O. Brissaud, P. Beck, B. Schmitt, Y. Magnard, J.-J. Correia, P. Rabou, L. Jocou, SHADOWS: A Spectro-Gonio Radiometer for Bidirectional Reflectance Studies of Dark Meteorites and Terrestrial Analogs: Design, Calibrations, and Performances on Challenging Surfaces, *Appl. Opt.* **57** (28) (2018) 8279.
- [45] E. Whalley, J.E. Bertie, The Far Infrared Spectrum and Long-Range Forces in Ice, *J. Colloid Interface Sci.* **25** (2) (1967) 161–165.
- [46] E.A. Cloutis, S.E. Grasby, W.M. Last, R. Léveillé, G.R. Osinski, B.L. Sherriff, Spectral Reflectance Properties of Carbonates from Terrestrial Analogue Environments: Implications for Mars, *Planet. Space Sci.* **58** (4) (2010) 522–537.
- [47] G.R. Hunt, R.P. Ashley, Altered Rock Spectra in the Visible and near Infrared, *Econ. Geol.* **74** (1979) 1613–1629.
- [48] S.J. Gaffey, Spectral Reflectance of Carbonate Minerals in the Visible and near Infrared (0.35–2.55 Microns); Calcite, Aragonite, and Dolomite, *Am. Mineral.* **71** (1–2) (1986) 151–162.
- [49] P.L. Harner, M.S. Gilmore, Visible-near Infrared Spectra of Hydrated Carbonates, with Implications for the Detection of Carbonates in Hyperspectral Data of Mars, *Icarus* **250** (2015) 204–214.
- [50] L.G. Benning, V.R. Phoenix, N. Yee, M.J. Tobin, Molecular Characterization of Cyanobacterial Silicification Using Synchrotron Infrared Micro-Spectroscopy, *Geochim. Cosmochim. Acta* **68** (4) (2004) 729–741.
- [51] J.N. Murdock, D.L. Wetzel, FT-IR Microspectroscopy Enhances Biological and Ecological Analysis of Algae, *Appl. Spectrosc. Rev.* **44** (4) (2009) 335–361.
- [52] M. Kansiz, P. Heraud, B. Wood, F. Burden, J. Beardall, D. McNaughton, Fourier Transform Infrared Microspectroscopy and Chemometrics as a Tool for the Discrimination of Cyanobacterial Strains, *Biotechnol. Bioinform.* **52** (3) (1999) 407–417.
- [53] B.F.I. Ftir, T. Özer, D. Yalçın, I.A. Erkaya, A.U. Udoh, Identification and Characterization of Some Species of Cyanobacteria, Identification and Characterization of Some Species of Cyanobacteria, Chlorophyta and Bacillariophyta Using Fourier-Transform Infrared (FTIR), *Spectroscopy*. (2019).
- [54] Stuart, B. *IR Spectroscopy-Fundamentals*; Wiley.
- [55] S. Vaidyanathan, G. Macaloney, B. McNeil, Fundamental Investigations on the Near-Infrared Spectra of Microbial Biomass as Applicable to Bioprocess Monitoring, *Analyst* **124** (2) (1999) 157–162.
- [56] S.M. Craven, F.F. Bentley, Far Infrared Group Frequencies. II. Primary Amines, *Appl. Spectrosc.* **26** (4) (1972) 449–453.
- [57] W. Fateley, F. Miller, Torsional Frequencies in the Far Infrared-II Molecules with Two or Three Methyl Rotors, *Spectrochimica Acta* **18** (4) (1962) 977–993.
- [58] B.M. Fischer, M. Walther, P.U. Jepsen, Far-Infrared Vibrational Modes of DNA Components Studied by Terahertz Time-Domain Spectroscopy, *Phys. Med. Biol.* **47** (21) (2002) 3807–3814.
- [59] J. Aizenberg, S. Weiner, L. Addadi, Coexistence of Amorphous and Crystalline Calcium Carbonate in Skeletal Tissues, *Connect. Tissue Res.* **44** (SUPPL. 1) (2003) 20–25.
- [60] Y. Burgula, D. Khali, S. Kim, S.S. Krishnan, M.A. Cousin, J.P. Gore, B.L. Reuhs, L.J. Mauer, Review of Mid-Infrared Fourier Transform-Infrared Spectroscopy Applications for Bacterial Detection, *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* **15** (2) (2007) 146–175.
- [61] D. Naumann, FT-Infrared and FT-Raman Spectroscopy in Biomedical Research, *Appl. Spectrosc. Rev.* **36** (2–3) (2001) 239.
- [62] W. Jiang, A. Saxena, B. Song, B.B. Ward, T.J. Beveridge, S.C.B. Myneni, Elucidation of Functional Groups on Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Surfaces Using Infrared Spectroscopy, *Langmuir* **20** (26) (2004) 11433–11442.
- [63] J. Huisman, G.A. Codd, H.W. Paerl, B.W. Ibelings, J.M.H. Verspagen, P.M. Visser, Cyanobacterial Blooms, *Nat. Rev. Microbiol.* **16** (8) (2018) 471–483.
- [64] N. Inaba, I. Kodama, S. Nagai, T. Shiraishi, K. Matsuno, A. Yamaguchi, I. Imai, Distribution of Harmful Algal Growth-Limiting Bacteria on Artificially Introduced Ulva and Natural Macroalgal Beds, *Appl. Sci.* **10** (16) (2020) 1–16.
- [65] H.W. Paerl, T.G. Otten, Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls, *Microb. Ecol.* **65** (4) (2013) 995–1010.
- [66] J.M. O'Neil, T.W. Davis, M.A. Burford, C.J. Gobler, The Rise of Harmful Cyanobacterial Blooms: The Potential Roles of Eutrophication and Climate Change, *Harmful Algae* **14** (2012) 313–334.
- [67] E. Garand, T. Wende, D.J. Goebbert, R. Bergmann, G. Meijer, D.M. Neumark, K.R. Asmis, C. Science, V. Di, L. Berkeley, Infrared Spectroscopy of Hydrated Bicarbonate Anion, *JACS* **4** (2010) 849–856.
- [68] M.R. Badger, T.J. Andrews, Photosynthesis and Inorganic Carbon Usage by the Marine I-FI, *Plant Physiol.* **70** (1982) 517–523.
- [69] E. Garand, T. Wende, D.J. Goebbert, R. Bergmann, G. Meijer, D.M. Neumark, K.R. Asmis, C. Science, V. Di, Berkeley, L. Infrared Spectroscopy of Hydrated Bicarbonate Anion, *JACS* **4** (2010) 849–856.
- [70] V.V. Shutova, E.V. Tyutyayev, A.A. Churin, V.Y. Ponomarev, CELL BIOPHYSICS IR and Raman Spectroscopy in the Study of Carotenoids of Cladophora Rivularis Algae, *Biophys. Res. Commun.* **61** (4) (2016) 601–605.
- [71] Cojoc, L. R.; Enache, M. I.; Neagu, S. E.; Lungulescu, M.; Setnescu, R.; Ruginescu, R.; Gomoiu, I. Carotenoids Produced by Halophilic Bacterial Strains on Mural Paintings and Laboratory Conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **2019**.
- [72] R. wang, Y. Ma, D.i. Zhang, W. Li, T. Coenye, H. Huang, Analysis of Polyphosphate during the Enhanced Biological Phosphorus Removal Process Using Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *E3S Web Conf*, EDP Sci. **145** (2020) 02077, <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014502077>.

- [73] J.L. Stewart, The IR Spectrum of the Nitrate Ion in Various Crystalline Environments (1965).
- [74] K. Stehfest, J. Toepel, C. Wilhelm, The Application of Micro-FTIR Spectroscopy to Analyze Nutrient Stress-Related Changes in Biomass Composition of Phytoplankton Algae. 43 (2005) 717–726.
- [75] L.G. Benning, V.R. Phoenix, N. Yee, K.O. Konhauser, The Dynamics of Cyanobacterial Silicification: An Infrared Micro-Spectroscopic Investigation, *Geochim. Cosmochim. Acta* 68 (4) (2004) 743–757.
- [76] M.J. Baker, J. Trevisan, P. Bassan, R. Bhargava, H.J. Butler, Using Fourier Transform IR Spectroscopy to Analyze Biological Materials. 9 (8) (2015) 1771–1791.

Annexe n°3

1 **Calcium speciation and coordination environment in intracellular amorphous calcium**
2 **carbonate (ACC) formed by cyanobacteria**

3

4 Neha Mehta¹, Delphine Vantelon², Juliette Gaëtan¹, Alejandro Fernandez-Martinez³, Karim
5 Benzerara^{1*}

6 ¹Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590. Institut de
7 Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), 4 Place Jussieu, 75005
8 Paris, France.

9 .

10 ²Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, Départementale 128, 91190 Saint-Aubin, France

11 ³Université Grenoble Alpes, Université Savoie Mont Blanc, CNRS, IRD, IFSTTAR, ISTerre, F-
12 38000 Grenoble, France.

13 *Corresponding author: karim.benzerara@sorbonne-universite.fr

14

15 **Keywords: biomineralization; cyanobacteria; amorphous calcium carbonate;**

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

Abstract

An increasing number of bacteria has been shown to form intracellular amorphous calcium carbonates (ACC), as previously observed for biomineralizing eukaryotes. Yet, the short-range order of these bacterial intracellular ACC remains largely unexplored. Because ACC in bacteria is easily lost upon sample preparation, the use of in-situ techniques is required to probe ACC within intact cells at the atomic scale. Here, we show the application of an in-situ technique, X-ray absorption near-edge spectroscopy (XANES), and extended X-ray absorption spectroscopy (EXAFS) to study the calcium (Ca) speciation and coordination environment in intact cells of diverse ACC-forming cyanobacteria. Our results show that XANES was effective in detecting ACC in intact cells. Between 60-85% of the total Ca in ACC-forming cyanobacteria strains is contained in the ACC phase and the rest in a single phase or a mixture of amorphous phases, possibly Ca complexed by organic molecules. Moreover, the short-range order of cyanobacterial ACC was different from eukaryotic ACC. This short-range order was similar to monohydrocalcite. These findings shed light on the fate of cyanobacterial ACC and the role of ACC-forming cyanobacteria in the Ca biogeochemical cycle.

51

52

53 **1. Introduction:**

54 Amorphous calcium carbonate (ACC) is a common precursor of carbonate eukaryotic biominerals
55 (e.g. ^[1-4]). The formation of such a precursor may be instrumental in the control of the ultimate
56 morphology, structure, and trace element chemical composition of the biomineralized structures
57 formed by organisms (^[5-7]). In its pure form, ACC is a soluble and reactive precipitate and is
58 generally perceived as relatively unstable under physiological conditions ^[1]. How organisms control
59 the formation, stability, and transformation of ACC remains a long-standing question in the field
60 of biomineralization ^[8-10]. Recent studies have shown that ACC is also widespread in bacteria
61 ^[9,11,12]. These bacteria are found in diverse environments including sediments, marine, freshwater,
62 and brackish water ^[11,13,14]. The repertoire of ACC-forming bacteria includes at least 21 strains of
63 cyanobacteria affiliated to diverse genera ^[15,16], one sulfur-oxidizing gammaproteobacterium
64 affiliated to *Achromatium*, and a group of bacteria called magnetotactic bacteria (MTB) affiliated
65 to Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria ^[8,9]. Using comparative genomics, Benzerara et
66 al. proposed that ACC formation in cyanobacteria is a genetically controlled process, involving a
67 new gene family ^[15]. The formation of ACC within the bacteria can occur in conditions in which
68 the extracellular medium is undersaturated, suggesting that ACC formation costs energy to the cells,
69 presumably in relation to the active sequestration of Ca ^[17]. Balancing this cost, multiple roles have
70 been proposed for ACC in bacteria including intracellular pH buffer, and storage form of calcium
71 (Ca) and carbon (C) ^[18]. Moreover, the ACC inclusions formed by some cyanobacteria strains
72 sequester high concentrations of alkaline earth elements such as Ba, Sr, or Ra, including the
73 radioactive isotopes (⁹⁰Sr and ²²⁶Ra), which holds two implications: 1) these cyanobacteria may be

74 overlooked actors in the biogeochemical cycles of these trace elements^[19,20]; (2) they may offer
75 some potential for remediating pollutions by these radioactive isotopes ^[21,22].

76 While pure abiogenic ACC is highly unstable, transforming within minutes to crystalline calcium
77 carbonate (CaCO₃) polymorphs such as calcite, or aragonite, ACC found in bacteria remains
78 relatively stable intracellularly with no obvious spontaneous transformation to crystalline phases
79 such as calcite ^[23]. This behavior is similar to stable biogenic ACC found in eukaryotes that remain
80 stable intracellularly ^[24]. While eukaryotes are known to form metastable biogenic ACC (aka
81 transient biogenic ACC), which acts as a precursor phase for the formation of calcite and aragonite
82 minerals in skeletal architectures, this metastability has not been observed yet in prokaryotes ^{[1–}
83 ^{4,25,26]}. Various organic or inorganic additives (Mg, P), structural water, and/or confinement of ACC
84 within small volumes, have been proposed to promote the stabilization of biogenic ACC ^[27–30].
85 Confinement may be one of the stabilizing mechanisms in cyanobacteria since Blondeau et al.
86 showed that cyanobacterial ACC granules are contained within an envelope of undetermined
87 biochemical composition, either a lipid monolayer and/or proteins ^[31].

88 Despite the widespread occurrence of ACC-forming bacteria and their biogeochemical
89 significance, little is known about the short-range structure of bacterial ACC. To date, our
90 knowledge of the short-range structure of ACC is derived from experimental work on eukaryotic
91 ACC. These studies show that biogenic and synthetic ACC have a distinct short-range order with
92 proto-structures resembling different crystalline calcium carbonate (CaCO₃) phases. For example,
93 ACC present in aragonitic freshwater snail *Biomphalaria glabrata* was found to have a short-range
94 order similar to aragonite ^[32]. Short-range ordering close to that of aragonite and calcite were found
95 in aragonitic larval mollusks and calcitic sea urchin structures, respectively^[1,33,34].
96 Monohydrocalcite-like ACC has also been referred to in a series of other organisms ^[24]. This

97 observation gave rise to the widely accepted notion that polyamorphism exists in biogenic ACC
98 [1,35]. These differences in short-range order are attributed to the organisms producing ACC and thus
99 might be genetically controlled (e.g. [1,4,28,36,37]). Although these studies have brought a novel
100 perspective to our understanding of biomineralization processes and nucleation pathways, there is
101 a lack of structural studies on ACC found in different types of bacteria.

102 This study aims to address this knowledge gap by characterizing the local structure of ACC found
103 in bacteria. This is not a trivial task because ACC in bacteria is easily lost upon sample preparation,
104 and therefore its study requires the use of in-situ techniques that could probe ACC within intact
105 cells at the atomic scale [22,38]. One such tool for the study of relatively disordered mineral phases
106 is X-ray absorption spectroscopy (XAS), comprising X-ray near-edge spectroscopy (XANES) and
107 extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) spectroscopy. XANES is particularly suited for
108 chemical speciation studies of elements [39] and has been widely used to study eukaryotic ACC (e.g.
109 [24,40,41]). EXAFS is another powerful tool to study amorphous precipitates such as ACC which lacks
110 long-range order and provides complementary information to depict the coordination symmetry,
111 bond distances, and the nature and number of the nearest neighboring atoms around Ca at high
112 spatial resolution. Several studies have used EXAFS at the Ca K-edge to study the short-range order
113 of biogenic ACC extracted from eukaryotes and synthetic ACC with a focus to understand
114 biomineralization and nucleation pathways (e.g. [34,41,42]). Accordingly, the objectives of the present
115 study are (1) to test the ability of Ca K-edge XANES to detect ACC within intact cells of bacteria;
116 (2) to characterize the local order of bacterial ACC using EXAFS and to compare it with the
117 reported structure of eukaryotic ACC. The ACC-forming cyanobacteria strains were selected here
118 as a model system for this study because (1) they are the only ACC-forming bacteria that can be

119 cultured in the laboratory; (2) they are phylogenetically and environmentally diverse, allowing the
120 study of the influence of different biological factors on intracellular ACC formation ^[14].

121 **2. Materials and method**

122 **2.1. Abiotic Ca-bearing reference phases**

123 Six powdered reference Ca-bearing mineral phases were studied here: calcite (CaCO_3), calcium
124 pyrophosphate ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), (all purchased from Sigma Aldrich
125 TM) and naturally occurring aragonite (CaCO_3) (sample from the mineral collection at Sorbonne
126 University, Paris, France). These references were selected to represent the type of phases expected
127 to be found in environments of interest and/or in cyanobacteria.

128 In addition to commercially available Ca-bearing references, a series of amorphous
129 calcium-magnesium carbonates (referred as ACC) samples were synthesized by adapting
130 previously reported methods [1]–[3]. They are labeled as ACC1 to ACC8 and syn ACC and their
131 synthesis conditions listed in Table S1. Briefly, the samples were precipitated by mixing two
132 solutions at concentrations listed in Table S1: (i) an aqueous carbonate solution containing K_2CO_3
133 (for syn ACC) or Na_2CO_3 (for ACC1–8) (pH = 11.4); and (ii) an aqueous calcium and magnesium
134 solution containing $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich) and $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (adjusted to pH = 8.6). Ultra-
135 pure water (MilliQ®) was used for all the preparations. All chemical used were analytical grade.
136 All solutions were prepared and kept in a 4°C fridge for several hours prior to the synthesis. The
137 calcium- and magnesium-containing solution was poured directly into the carbonate solution, under
138 constant stirring. The resulting precipitate was isolated by centrifugation, washed twice with
139 anhydrous ethanol, and dried either in a dry desiccator (for ACC1–8) or at 37°C for 7 days (syn
140 ACC). The amorphous character of ACC1–8 and syn ACC was confirmed by quick X-ray
141 diffraction (XRD) (data shown only for syn ACC), that showed only broad peaks, confirming that

142 the synthesis resulted in an amorphous phase (Figure S1). The Ca:Mg ratio of the ACC1–8 samples
143 was determined using a Varian 720 ES ICP optical emission spectrometer (Geochemistry-
144 Mineralogy platform, ISTERre, Grenoble). A few milligrams of each sample were dissolved in 2%
145 HNO₃ prior to the ICP measurements. For syn ACC, previous reports using the same synthesis
146 protocols resulted in Ca:Mg molar ratio of 2.5 [4]. Attenuated total reflectance Fourier Transform
147 infrared spectroscopy (ATR-FTIR) was performed on a selected synthetic ACC sample: syn ACC.
148 For FTIR analysis: ATR-FTIR spectra were acquired over the mid-IR region (600-4000 cm⁻¹) using
149 a NICOLET 6700 FT-IR spectrometer equipped with a diamond internal reflection element (IRE),
150 a KBr beam splitter and a mercury cadmium telluride (MCT) detector. The dry synthetic ACC
151 sample was mounted on the diamond IRE. Spectra were accumulated by collecting 64-100 scans at
152 a resolution of 1 cm⁻¹. The characterization of synthesized ACC using FTIR showed presence of a
153 shoulder at 1474 cm⁻¹ and the absence of a peak at 712 cm⁻¹ (Figure S2), both of which are
154 characteristic of ACC [5]. Synthesized ACC was stored at room temperature in a desiccator and
155 remained amorphous for at least 1 year, as confirmed by XRD and FTIR spectroscopy (data not
156 shown).

157 **2.2. Cyanobacteria cultures**

158 Here, we refer to strains forming intracellular ACC as ACC+ strains and strains not forming
159 intracellular ACC as ACC- strains. We studied three ACC- strains and six ACC+ strains. These
160 strains were *Synechocystis* PCC 6803 (ACC-), *Microcystis* PMC 568 (ACC-), *Microcystis* PMC
161 810 (ACC-), *Cyanothece* PCC 7425 (ACC+), *Synechococcus* PCC 6312 (ACC+), *Microcystis* PMC
162 827 (ACC+), *Microcystis* PMC 831 (ACC+) and *Candidatus Thermomargartia ahousahtiae*
163 (ACC+). All strains were cultured in a standard BG-11 medium[6]. Except the *Microcystis* strains
164 (PMC 569, PMC 810, PMC 827, PMC 831), the rest of the strains were cultured under continuous

165 agitation and continuous light ($5-10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). All *Microcystis* strains were grown without
166 agitation, at $23 \text{ }^\circ\text{C}$, with a 12:12 photoperiod and a light intensity of $\sim 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The cell
167 suspensions of all the strains were harvested by centrifugation, rinsed, and dried at $40 \text{ }^\circ\text{C}$ for 48
168 hours. The presence/absence of ACC in these different strains was assessed in a previous study by
169 FTIR spectroscopy and electron microscopy [5], [7].

170 **2.3 Ca K-edge XANES/EXAFS spectroscopy of biomass and abiotic Ca-bearing references:**

171 Dried biomass samples were diluted in cellulose and pressed into a 10 mm diameter pellet and
172 mounted on Ca-free holders. XAS at the Ca K-edge was performed on the LUCIA beamline at the
173 SOLEIL synchrotron (Saint-Aubin, France)[8], [9]. The fixed exit double-crystal monochromator
174 was equipped with Si (111) crystals. Spectra were recorded in fluorescence mode for biomass
175 samples using a 60 mm^2 mono-element silicon drift diode detector (Bruker), and in transmission
176 mode for Ca-bearing crystalline references and syn ACC using a silicon diode. The optimal amount
177 of reference sample needed to prepare pellets for analysis in transmission mode was calculated
178 using the X-ray absorption calculator XAFSmass
179 (www.cells.es/Beamlines/CLAESS/software/xafsmass.html), to yield a theoretical edge jump of
180 ~ 1 . In the pre-edge region (3940-4030 eV) the spectra were collected with a step-size and a counting
181 time of 2 eV and 1s. The edge region (4030-4070 eV) was scanned with a step size and a counting
182 time of 0.25 eV and 1 s. The EXAFS region (6270-6710 eV) was scanned with a step size increasing
183 from 0.5 to 3 eV and a counting time from 1 to 3s. Typically, 2-3 scans were acquired per sample
184 in fluorescence or transmission mode, which were then averaged. In some case, 5-7 scans were
185 acquired to obtain high signal-to-noise ratio in the EXAFS region. Each scan lasted for ~ 50 min in
186 duration. In both modes, sample holder was positioned at 5° with respect to the fluorescence
187 detector to minimize self-absorption effects and maintained at a temperature of 77K using a liquid

188 He-cryostat to minimize potential beam damage and localized heating. The energy was calibrated
189 using the calcite reference for which the first inflection point was set to 4045 eV.

190 Calcium K-edge XANES spectra of the ACC#1–#8 were collected at the beamline “XAFS” of
191 synchrotron Elettra (Trieste, Italy)[10]. Spectra were collected at the Ca K-edge (4038 eV) using a
192 Si 111 monochromator, in transmission mode at a temperature of 100 K. Samples were prepared in
193 the form of pellets, diluted with graphite powder. Spectra were taken using the current in two
194 ionization chambers placed before and after the sample. Samples of calcite, a nanocalcite, a Mg-
195 calcite, dolomite and aragonite were measured at synchrotron Elettra as standards (data not shown).

196 **2.4 XANES/EXAFS data analysis:**

197 All XANES data were processed using the Athena software [11] including the Autbk algorithm
198 (Rbkb = 1, k-weight = 3). Since the Ca K-edge XANES dataset of series of ACC1–8 and syn ACC
199 were acquired at different beamlines, they were aligned in energy using syn ACC as the reference
200 prior to normalizing the spectra. Normalized Ca-K edge spectra were obtained by fitting the pre-
201 edge region with a linear function and the post-edge region with a quadratic polynomial function.
202 The angle to the detector and the Ca concentration in the samples were low enough to prevent self-
203 absorption effect. Thus they were not corrected. There was some correction made on the references
204 but as far as I remember and understand from the article, only the signal collected in transmission
205 was used. The XANES derivative spectra of ACC+ cyanobacteria strains were analyzed by linear
206 combination fitting (LCF) available in the Athena software in the range 4028-4068 eV; all
207 components' weights were forced to be positive. The LCF of Ca K-edge XANES derivative spectra
208 of ACC (+) cyanobacteria strains was performed with two components: 1) synthetic ACC
209 representing Ca speciation in the ACC; the different synthetic ACC with varying Ca: Mg ratio were
210 used as a reference for synthetic ACC. (2) ACC (-) cyanobacteria strain that corresponds to non-

211 ACC matrix present in cyanobacteria. *Synechocystis* PCC 6803 (ACC-) was used as a reference fit
212 component for strain *Cyanothece* 7425 (ACC+), *Ca. T. ahoussane* (ACC+), and *Synechococcus*
213 6312 (ACC+). *Microcystis* PMC 810 (ACC-) was used as a reference fit component for strains
214 *Microcystis* PMC 831 (ACC+) and *Microcystis* PMC 827 (ACC+). We note that the fit of all
215 *Microcystis* (ACC+) strains remained unaffected when *Microcystis* PMC 568 (ACC-) was used as
216 a reference fit component instead of *Microcystis* PMC 810 (ACC-) (Table S3). The best LCF fit
217 was determined for the minimum two-components for which the R-factor was better than 10% of
218 the fit with three components.

219 The Fourier transform of the k^3 -weighted EXAFS spectra was calculated over the range
220 of 2.8-11.3 \AA^{-1} using a Hanning apodization window ($dk = 1$). The EXAFS data were fitted in the
221 1.3–4.0 \AA distance range with the ARTEMIS interface to IFEFFIT (Ravel and Newville, 2005)
222 using least-squares refinements. Paths used for fitting were calculated from the aragonite
223 structure[12] using the FEFF6 algorithm included in the ARTEMIS interface.

224 **3. Result and Discussion**

225 **3.1. XANES spectra of synthetic ACC and cyanobacterial strains**

226 The Ca K-edge XANES spectra were acquired for a series of synthetic ACCs that were
227 synthesized with varying Ca: Mg molar ratios ranging between 0.8 to 8.6 (Table S1). No differences
228 were observed in the Ca K-edge XANES spectra of the synthetic ACCs (Figure S3). Thus, for
229 simplicity, hereafter, we refer to one representative synthetic ACC only (syn ACC) that contained
230 a Ca: Mg molar ratio of 2.5 [43]. The Ca K-edge normalized absorption and derivative spectra of a
231 syn ACC and abiotic Ca-bearing reference phases (calcite, aragonite, hydroxyapatite, and calcium
232 pyrophosphates) are shown in Figure 1A-B (the data processing is described in section 2). Several
233 features are observed in the XANES spectrum of syn ACC that distinguish it from other Ca-bearing

234 reference compounds. First, the XANES spectrum of syn ACC has a pronounced pre-edge feature
235 A_1 at 4040.46 eV ($1s \rightarrow 3d$ type transition), which is absent in calcite and more discreet in aragonite
236 (Figure 1A). This may indicate a deviation of ACC structure from centrosymmetric structures like
237 those of calcite and aragonite ^[44] ^[45]. Second, the B_1 feature in the derivative XANES spectrum of
238 syn ACC at 4043.41 eV ($1s \rightarrow 4s$ type transition), was weak, whereas it was pronounced in calcite,
239 aragonite, hydroxyapatite, and calcium pyrophosphate (Figure 1B). Moreover, the position of B_1 at
240 4043.41 eV, as seen in the derivative XANES spectrum of syn ACC, was shifted compared with
241 other phases such as calcite ($\Delta E = -0.16$ eV), aragonite ($\Delta E = -0.48$ eV), hydroxyapatite ($\Delta E = 0.89$
242 eV), calcium pyrophosphate ($\Delta E = 1.14$ eV), suggesting that the position of the B_1 feature at 4043.41
243 eV was a characteristic feature of ACC (Figure S4). This may result from a difference in the
244 symmetry of the environment around the Ca atom in syn ACC as compared with the references
245 used here ^[46]. Third, the derivative XANES spectrum of syn ACC has a feature C_1 at ~ 4045 eV,
246 which is absent in hydroxyapatite and calcium pyrophosphate, and sharper and pronounced in
247 calcite and aragonite (Figure 1B). Lastly, the syn ACC shows a single broad peak D_1 at the
248 absorption edge at ~ 4048 eV without the splitting seen in calcite and hydroxyapatite or any
249 pronounced features seen at energies greater than 4050 eV for aragonite, calcite, and hydroxyapatite
250 (Figure 1A). The differences in spectral features (i.e. A_1 , B_1 , C_1 , D_1 in Figure 1A-B) between syn
251 ACC and other Ca-bearing phases are consistent with previous studies showing that XANES at Ca
252 K-edge is efficient in discriminating between ACC and crystalline Ca-carbonate phases and other
253 Ca-containing phases (e.g. ^[45-49]). Below we discuss how these spectral characteristics appear when
254 comparing Ca K-edge XANES spectra of intact cells of ACC-forming cyanobacteria strains
255 (referred to hereafter as ACC (+) strains), and intact cells of cyanobacteria strains not forming ACC
256 (referred to hereafter as ACC (-) strains).

257 Figure 1C shows normalized Ca K-edge XANES spectra for ACC (+) (#1 to #5) and ACC (-
258) (#6 to #8) cyanobacteria strains along with reference syn ACC. All the strains irrespective of ACC
259 forming capability had a pre-edge feature A_2 at 4040 eV and an absorption edge D_2 at 4048.45 eV.
260 These XANES features matched that of syn ACC perfectly well (A_1 at 4040 eV and D_1 at 4048.45
261 eV). No additional XANES features were observed in the XANES spectra of all cyanobacteria
262 strains, suggesting the absence of any additional crystalline Ca-bearing phase. In contrast, notable
263 differences were observed upon comparing the derivative XANES spectra ACC (+) and ACC (-)
264 cyanobacteria strains. While all cyanobacteria strains (ACC (+) and ACC (-)) had a feature in
265 derivative XANES spectra at 4045.02 eV (labeled as C_2) that coincides with the C_1 feature observed
266 in syn ACC, only ACC (+) cyanobacteria strains (#1-5) had a clear feature at 4043.41 eV, labeled
267 as B_2 in the derivative XANES spectra, that coincides with the characteristic position of the B_1
268 feature in the derivative XANES spectrum of syn ACC (Figure 1D). This suggests that the presence
269 of the B_2 feature in ACC (+) cyanobacteria and its absence in ACC (-) cyanobacteria strain was due
270 to the presence of ACC in the cells, which means that our experimental approach and methodology
271 were able to detect ACC in intact cells of different cyanobacteria strains. Furthermore, except for
272 the position of the B_1 feature, other characteristic spectral features of ACC (i.e. A_1 , C_1 , D_1) were
273 not effective in discriminating between the Ca environment found in ACC (+) and ACC (-)
274 cyanobacteria strains.

275 Interestingly, the B_1 feature was also reported in the ACC of body spicules but not in the
276 ACC from the lobster carapace and plant cystoliths [24]. However, we note that we used derivative
277 XANES spectra to clearly detect the B_1 feature in ACC (+) cyanobacteria, whereas no derivative
278 spectra of the different eukaryotic ACC were examined by the previous studies to the best of our
279 knowledge. Overall, this may have led to missed detection of the weak B_1 feature of ACC in lobster

280 carapace and plant cystolith. Alternatively, the inconsistency between the XANES spectral features
281 observed in eukaryotic ACC and cyanobacteria ACC could be simply because they both are
282 different ACC. Indeed, they have different chemical compositions. For example, ACC in plant
283 cystolith has 26 atoms % magnesium (Mg) and no phosphorus (P); ACC in spicules of *Pyrua*
284 *pachydermatina* has 0-16 atom % Mg and up to 55 atom % P; ACC in lobster carapace has 12-20
285 atom % Mg, and 33-49 atom % P, whereas ACC in cyanobacteria contains less than 3 atom % Mg
286 and up to 1.7 atom % P ^[19,24] (Table S2). However, several observations suggest that the variation
287 in the Mg and P content of ACC was not correlated with the presence or absence of the B₁ feature.
288 First, despite comparable P contents of ACC in spicules of *Pyrua pachydermatin* and ACC in the
289 lobster carapace, the B₁ feature was only detected in the ACC in spicules. Furthermore, syn ACC
290 had 25 atoms % of Mg and still showed the presence of the B₁ feature in its XANES spectrum. Last,
291 the XANES Ca K-edge spectra collected on the series of synthetic ACC containing varying Ca: Mg
292 content all showed the B₁ feature (Figure S3). Biogenic ACC is also known to contain organic
293 additives as stabilizing agents ^[50,51]. Whether variations in organic content of biogenic ACC could
294 possibly be linked with the presence or absence of B₁ feature remains unknown. Indeed, in the
295 derivative Ca K-edge XANES spectra of Ca complexed with different organic ligands such as
296 oxalate, humus, and acetate, the B₁ feature was not found ^[52]. However, due to the paucity of reliable
297 quantitative data about the organic content of different biogenic ACC (eukaryote and bacterial),
298 further exploration of the role of organic additives on appearance of B₁ feature remains limited for
299 the moment, but an interesting topic for future studies. Nevertheless, the perfect match of the
300 spectral feature of syn ACC and ACC (+) cyanobacteria strains, the absence of crystalline
301 carbonates signatures in XANES spectrum of ACC (+) cyanobacteria strains, the presence of the
302 B₁ feature in ACC (+) cyanobacteria strains at position that coincides with the characteristic B₁

303 feature of syn ACC and its absence in ACC (-) cyanobacteria strains, confirm that 1) XANES was
304 effective in detecting ACC in intact cells of cyanobacteria, and the sample preparation method did
305 not induce any ACC crystallization that could be detected by XANES, and 2) the position of feature
306 B₁ in derivative XANES spectrum of syn ACC is a promising diagnostic indicator of ACC presence
307 in the cyanobacteria strains. The feature is weak and can be readily overlooked from a cursory
308 examination of XANES spectra or potentially in ACC associated with higher proportions of
309 organics. The generalization of the B₁ feature as a universal indicator of eukaryotic and prokaryotic
310 ACC remains to be seen in future studies, but based on our results, this feature appeared as a reliable
311 diagnostic of ACC in cyanobacteria.

312
313
314

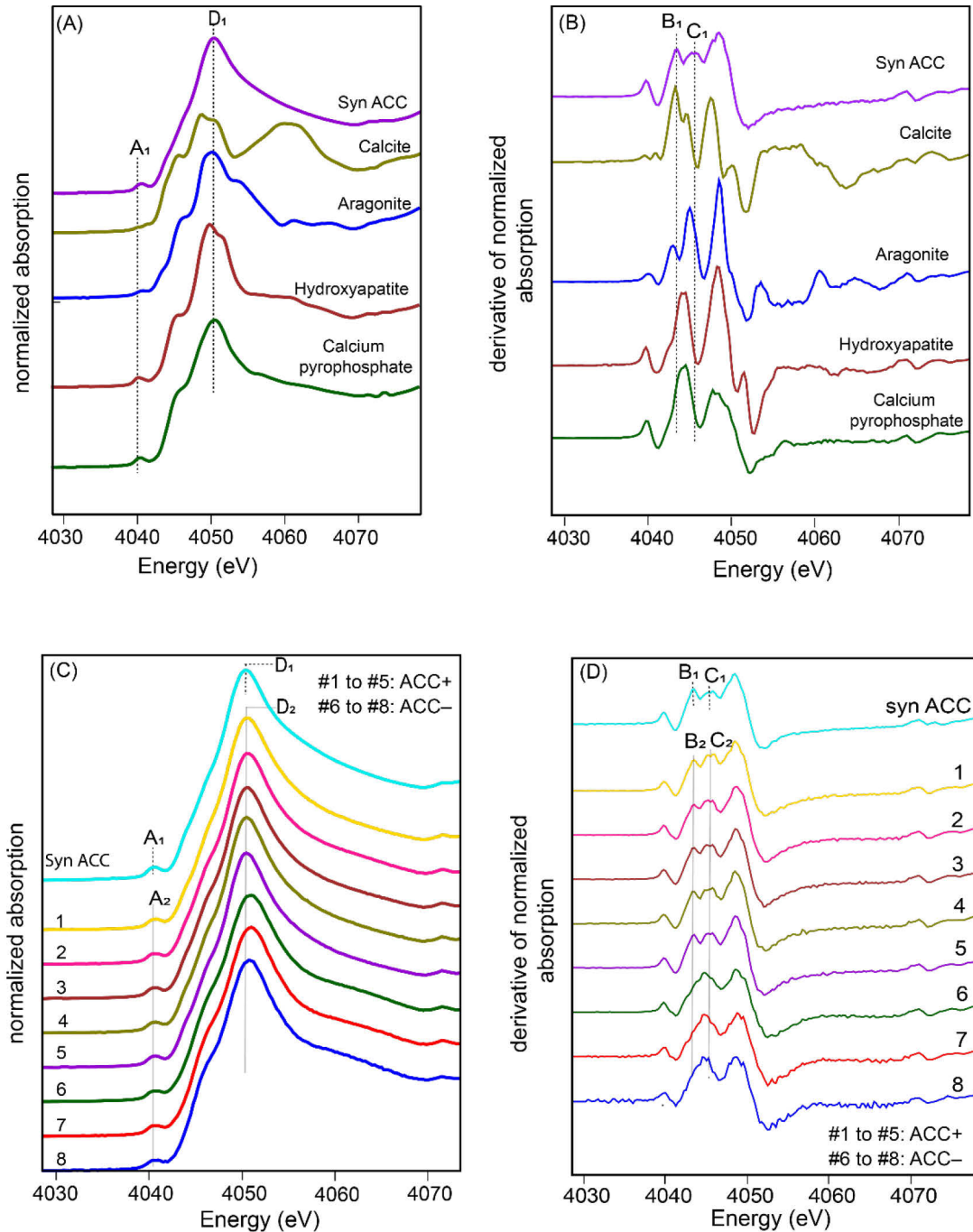


Figure 1: (A) Normalized XANES spectra of syn ACC and other abiotic Ca-bearing reference compounds. (B) derivate XANES spectra of syn ACC and other abiotic Ca-bearing reference compounds. (C) Normalized Ca-K edge and (D) derivate XANES spectra of ACC+ and ACC- cyanobacteria strains as denoted by #1-8: (1) *Ca. T. ahoussane* (ACC+), (2) *Microcystis* sp. PMC 831 (ACC+), (3) *Microcystis* sp. PMC 827 (ACC+), (4) *Synechococcus* sp. 6312 (ACC+), (5) *Cyanotheca* sp. PCC 7425 (ACC+), (6) *Microcystis* sp. PMC 568 (ACC-), (7) *Microcystis* sp. PMC 810 (ACC-), (8) *Synechocystis* sp. PCC 6803 (ACC-). Synthetic ACC spectra (syn ACC) shown for reference. The dashed lines indicate the position of spectral features A₁, B₁, C₁ and D₁ in XANES and derivate XANES spectrum of syn ACC. The solid grey lines indicate the position of A₂, B₂, C₂, D₂ in XANES and derivate XANES spectra of ACC (+) cyanobacteria strains (See text for details).

315 We used linear combination fitting (LCF) to quantify the proportion of different Ca reservoirs in
316 ACC (+) cyanobacteria strains. These spectra were fitted under the assumption that there are two
317 different environments for Ca speciation in ACC (+) cyanobacteria strains: 1) intracellular ACC
318 and 2) a non-ACC matrix that represents all Ca contained inside/at the surface of the cells in a form
319 different from ACC (e.g., Ca complexed by organics; Ca associated with polyphosphates). Based
320 on this fit, it is then possible to assess the proportion of Ca contained within ACC over the total Ca
321 reservoir. Detailed LCF fit analyses are provided in section 2. The fit results are shown in Figure 2
322 and Table S3. Depending on the strain, the proportion of Ca in ACC to total Ca in ACC (+)
323 cyanobacteria strains ranged from 60-84%, with an error on the weight of each component assessed
324 to ~ 10% (Figure 2B). The variation in the proportion of Ca in ACC to total Ca in ACC (+)
325 cyanobacteria strains is consistent with the previous studies estimating ACC content in ACC (+)
326 cyanobacteria strains and suggesting a variable ACC content between strains ^[53]. The exact reasons
327 underlying the differences in the proportion of Ca in ACC across strains remain unknown. Some
328 hypothesis includes differences in the use and function of Ca in ACC among strains, and variation
329 in cellular Ca demand among strains. Nevertheless, our results confirm that ACC is the largest
330 reservoir of Ca in ACC-forming cyanobacteria. These findings are relevant when considering the
331 role of ACC-forming bacteria in the Ca biogeochemical cycle. To date, the documented occurrence
332 of ACC-forming bacteria in the environment is often mixed with other Ca-containing phases such
333 as crystalline calcium carbonates or Ca-P-containing phases, especially when the extracellular fluid
334 is oversaturated with respect to these phases ^[54]. Such co-occurrence makes it challenging to
335 quantify the relative importance of ACC-forming bacteria compared to other Ca-bearing phases.
336 Our proposed methodology could be an effective tool to address this challenge as this approach

337 quantifies Ca phases at a bulk scale and unambiguously discriminate between amorphous vs
338 crystalline Ca-containing carbonates and Ca-P bearing phases.

339

340

341

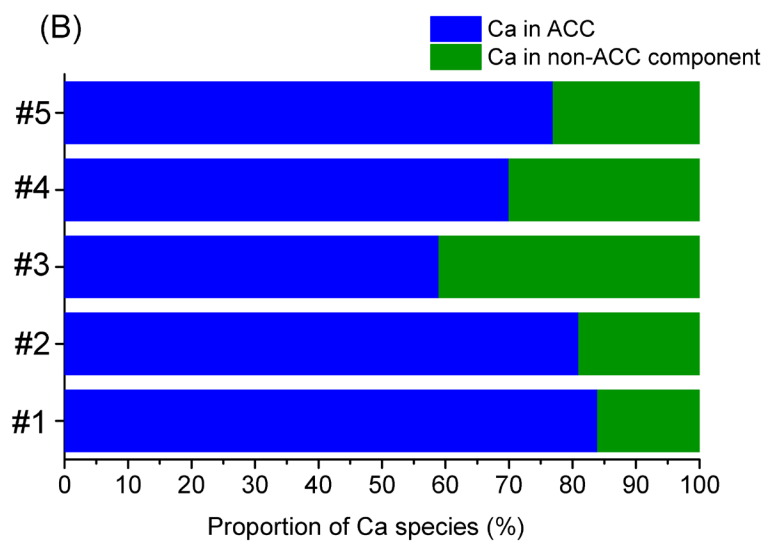
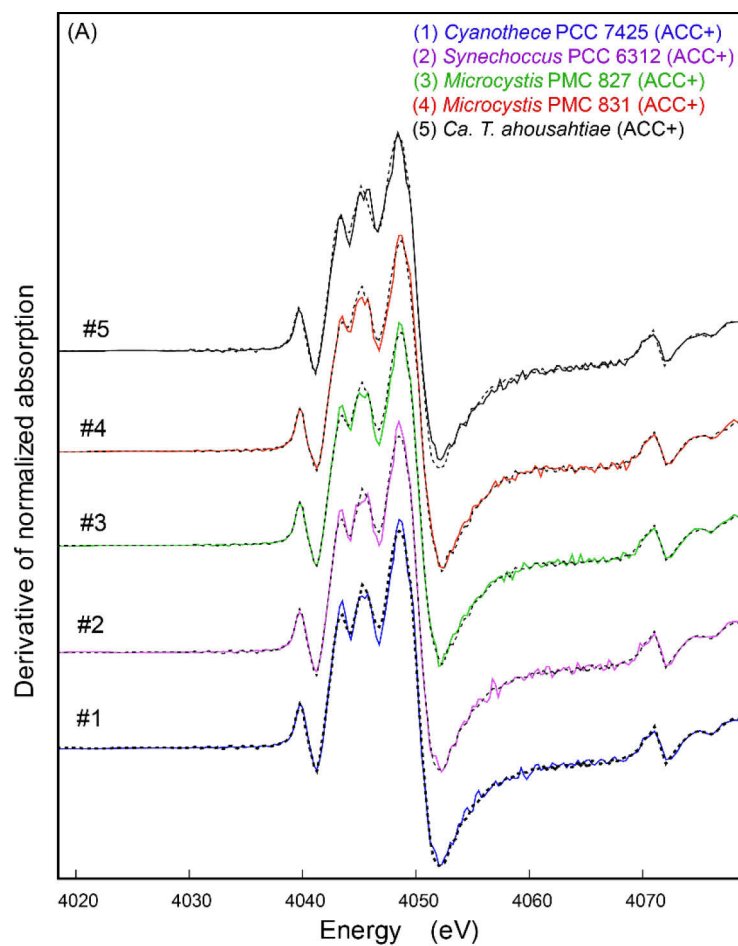
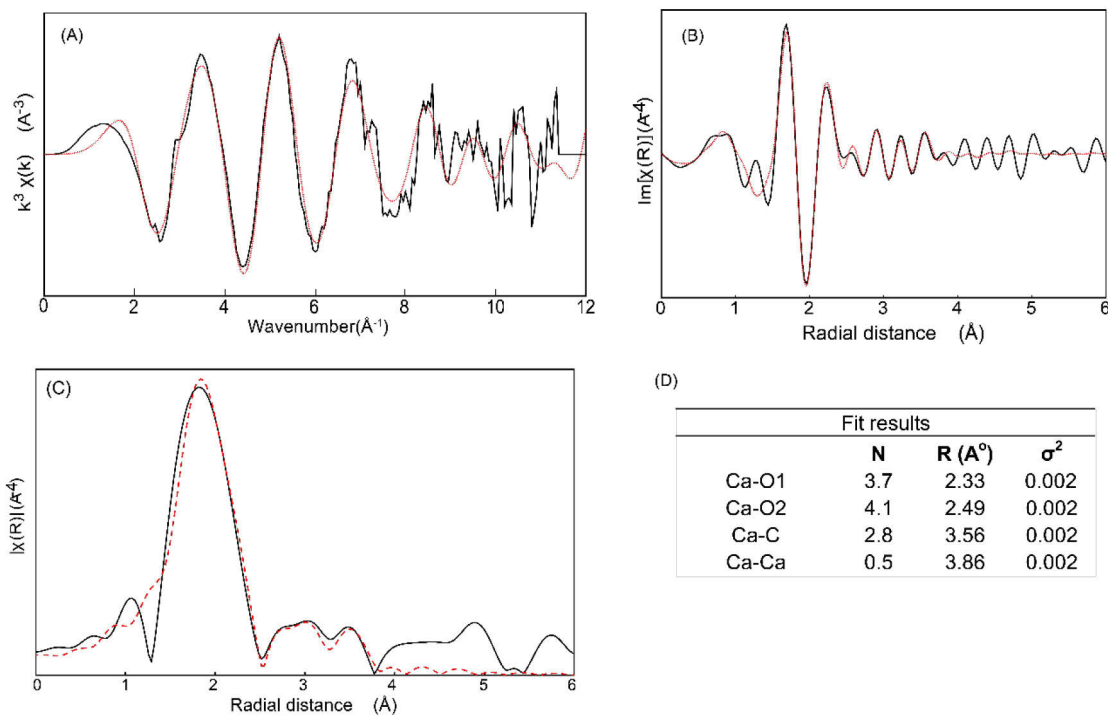


Figure 2: (A) Ca-K edge spectra of ACC (+) strains. Solid lines are experimental data and dotted lines are the LCF results. (B): Proportion of ACC and ACC (-) strain to Ca speciation in ACC (+) strains determined by LCF of the XANES data shown in Fig. 1. The error on the weight of each component is $\sim 10\%$.

342 **3.2. Local order of cyanobacterial ACC**



343
 344 Figure 3: Ca K-edge EXAFS (A), imaginary part (B) and magnitude of Fourier transformed spectrum of
 345 *Cyanothecce* sp. PCC 7425 (ACC+) in solid black line and model fit shown in red dotted line. The EXAFS
 346 data were fitted in the 1.3–4.0 \AA distance range. (D) The fitted values of coordination number, radial
 347 distance, and associated Debye-Weller factors for each shell are summarized. The amplitude reduction
 348 factor S_0^2 and ΔE_0 were respectively set to 3.3 and 0.41 eV. The R-factor for the fit was 0.0317 and the
 349 reduced chi-square was equal to 11.56. N is the coordination number of the scatter in the shell, and R is the
 350 bond distance between the scatterer (Ca, C, O) from Ca. The error on N, R, and Debye-Weller factors (σ^2)
 351 are 10%, 1%, and 20% respectively.
 352

353 Fourier transformed EXAFS in R space for *Cyanothecce* PCC 7425 (ACC+) along with a
 354 model fit and the best-fit parameters are shown in Figure 3. EXAFS spectra of other ACC+ and
 355 ACC- strains are shown in Figure S5. Since the EXAFS spectra of all ACC+ strains looked similar,
 356 the rest of the discussion will focus on *Cyanothecce* sp. PCC 7425 as one representative of all ACC+
 357 strains, which will be referred to as cyanobacterial ACC (Figure S5). The EXAFS spectrum of
 358 cyanobacterial ACC was fitted using three shells of scatters. The first coordination shell was fitted
 359 with a split shell of

	<i>Ca-O</i>			<i>Ca-C</i>			<i>Ca-Ca</i>		
	CN	R	σ^2 (Å ²)	CN	R	σ^2 (Å ²)	CN	R	σ^2 (Å ²)
ACC in cyanobacteria (this study)***	3.7 4.1	2.33 2.49	0.002 0.002	2.8	3.56	0.025	0.5	3.86	0.002
ACC in plant cystoliths <i>Ficus microcarpa</i> [24]***	2.3 3.3	2.22 2.42	0.005 0.0002	2*	3.5	0.040	4*	3.79	0.013
ACC in carapaces of <i>Homarus American</i> [24]***	1.9 3.9	2.23 2.41	0.005 0.003	4*	3.47	0.013	2*	3.79	0.013
ACC in spicules of <i>Pyura Pachyderma tina</i> [24]***	7.4	2.374	0.009	1.5 3	3.03 3.36	0.006 0.000			
ACC in sternal deposits of <i>Porcellio scaber</i> [41]**	3.8	2.38	0.014	1.4 0.4	3 3.72	0.007 0.001	6	3.89	0.109
ACC in larval shells of <i>Biomhalaria gabrata</i> [32]**	9	2.44	0.0309				6	3.92	0.047
Calcite [41]	6	2.33	0.009	6	3.27	0.035	6	4.05	0.009
Aragonite [41,46]	3 6	2.21 2.43	0.005 0.009	3 3	2.98 3.26	0.003 0.010	6	3.94	0.028
Monohydrocalcite [42]	8.2	2.42	-	3.04	2.98		2	3.83	
Vaterite [46]	6	2.37	0.013				6	4.21	0.023

* fixed parameter during the fitting

** Transient biogenic ACC

*** Stable biogenic ACC

360 Table 1: EXAFS fitting of the Ca K-edge data for the cyanobacterial ACC and representative eukaryotic ACC and crystalline CaCO₃
361 samples. *CN* is the coordination number, and *R* is the bond distance of the scatterer from Ca.

362

363 7.8 oxygen (O) atoms, 3.7 atoms at 2.33 Å, and 4.1 atoms at 2.49 Å. The splitting of the Ca-O
364 bond distance in cyanobacterial ACC was consistent with the previous studies on biogenic stable
365 ACC as well as synthetic ACC [45]. The second coordination shell was fitted with 2.8 carbon (C)
366 atoms at 3.56 Å. The Ca-C bond distance in cyanobacterial ACC is similar to the monodentate
367 linkages present in crystalline carbonates, suggesting that Ca and C associations in cyanobacterial
368 ACC are predominantly monodentate [45]. Lastly, the third coordination shell is composed of 0.5
369 Ca atoms at 3.86 Å. The addition of more shells did not improve the fit quality. Upon comparing
370 the Ca coordination environment between cyanobacterial ACC and non-cyanobacterial biogenic
371 ACC, certain similarities and differences can be identified (Table 1). Broadly, the Ca-O and Ca-C
372 coordination number (CN) and bond distances of cyanobacteria ACC are consistent with the ranges
373 reported for other biogenic stable ACC phases (Table 1). Cyanobacterial ACC has the lowest
374 number of Ca neighbors (0.5 Ca atoms) compared to other biogenic ACC (2-6 Ca atoms). Dilution
375 of Ca-Ca coordination environment in cyanobacterial ACC by non-ACC components could result
376 in low Ca CN. Such dilution was likely minimized in other occurrences of biogenic ACC that had
377 higher Ca CN, possibly because in these cases the ACC was separated from the organism (Table
378 1). In the case of bacterial ACC, isolation of ACC from the cells was not possible because it tends
379 to dissolve and/or transform [22,38]. Alternatively, higher Debye-Waller sigma square (σ^2) values
380 for the EXAFS fit of previously reported biogenic ACC (0.047-0.109) relative to cyanobacterial
381 ACC (0.002) could also increase the Ca CN [24,32,55]. Last, a low Ca-Ca coordination number should
382 be interpreted cautiously due to the large uncertainty associated with coordination number (20%).

383 Furthermore, the number of O atoms surrounding Ca in cyanobacterial ACC (7.8) is closer
384 to that in monohydrocalcite (MHC) (8.2 O atom) than aragonite (9 O atom), within an uncertainty
385 of 20% (Table 1). The number of Ca atoms in the fourth co-ordination shell in cyanobacterial ACC

386 (0.5 Ca atom) is also closer to MHC (2 Ca atom) than any other CaCO₃ crystalline polymorph,
387 within an uncertainty of 20% (Table 1). The distance of the Ca–Ca shell is significantly shorter at
388 3.83 Å in cyanobacterial ACC compared with calcite (4.06 Å), vaterite (4.21 Å), and aragonite
389 (3.99 Å), and closer to MHC (3.89 Å) (uncertainty 1%). These observations suggest that the local
390 order of cyanobacterial ACC encodes an MHC-like structure. Other occurrences of biogenic stable
391 ACC such as the body spicules of the ascidian *Pyura pachydermatina*, ACC located in the carapace
392 of the lobster *Homarus americanus*, and cystoliths from the leaves of the plant *Ficus microcarpa*
393 are also described as possessing short-range structures resembling MHC [24]. Such a resemblance
394 may indicate a stoichiometry of ACC similar to that of MHC (CaCO₃.H₂O) [7,42,53]. No direct
395 measurements of the water content of cyanobacterial ACC were done. However, we note that
396 cyanobacterial ACC is stable and that so far all biogenic stable ACC occurrences are hydrated^[10].
397 Indeed, the incorporation of water in ACC has been linked to hampering the rearrangement of ions,
398 thereby stabilizing ACC against crystallization [56]. Second, water bands have been identified in
399 cyanobacterial ACC FTIR spectrum^[53]. Overall, we conclude that the cyanobacterial ACC phase
400 is most likely hydrated and a stable ACC phase, and MHC is a suitable structural model for
401 biogenic stable ACC not only in eukaryotes but also in ACC-forming cyanobacteria.

402 The incipient structure encoded in biogenic ACC may be linked to the structure of the
403 final crystallization product of ACC, which is relevant when considering the fate of cyanobacterial
404 ACC in the extracellular environment, although this has not been studied yet. Under some
405 conditions there seems to be a direct transformation of ACC to a crystalline carbonate that involves
406 dehydration of ACC and subsequent structural rearrangement of ACC to a crystalline carbonate
407 (e.g.^[29,57,58]). Schmidt et al. in showed that in synthetic ACC, dehydration proceeds without
408 significant changes in the immediate environment around the Ca ions, suggesting that the incipient

409 structure might remain preserved during ACC transformation ^[59,60]. Consistently, syntheses of
410 ACC in presence of aspartic acid showed short-range structures resembling vaterite, and upon
411 crystallization produced a mixture of vaterite and calcite and ultimately calcite^[46]. Hasse et al.
412 suggested that ACC in the embryo of freshwater snail encoded an aragonite-like structure, which
413 later transformed into an aragonitic shell of the adult snail ^[32]. Based on the encoding of MHC-
414 like structure in cyanobacterial ACC, one possible hypothesis regarding the fate of cyanobacterial
415 ACC upon cell death could be that upon cell death cyanobacterial ACC may transform to MHC
416 outside the cell, where MHC may dissolve or transform into other polymorphs of CaCO₃ or
417 remains stable^[54]. Either of these outcomes will undoubtedly rely on the extracellular fluid
418 chemistry of environments hosting ACC-forming cyanobacteria.

419 While encoding of MHC in the local order of cyanobacterial ACC provides clues
420 regarding its extracellular stability and fate of cyanobacterial ACC in the environment, the
421 relationship between the intracellular stability of cyanobacterial ACC and local order is unclear.
422 One of the prevailing hypotheses for the stabilization of biogenic stable ACC suggests that the
423 creation of a unique microenvironment around ACC inhibits the formation of crystal nuclei,
424 thereby stabilizing ACC ^[1]. The creation of this environment is biologically controlled and
425 mediated through the action of biological macromolecules, and additives such as magnesium (Mg)
426 and phosphorus (P) ^[50]. The effect of these additives is not easily discernible in the local order of
427 biogenic stable ACC as evidenced by previous unsuccessful attempts to fit a Ca-Mg or Ca-P path
428 to the local structure of biogenic stable ACC and in this study as well (data not shown) ^[40]. These
429 observations suggest that the concentrations of these additives are too low to be visible in EXAFS,
430 suggesting that if there is Mg or P contribution to the local order, it is not substantial. Similar

431 conclusions were reached by Addadi et al^[40]. Nevertheless, the presence of a distinct short-range
432 order in cyanobacterial ACC is an indication of biological control on stabilizing ACC.

433 **3. Conclusions**

434 To summarize, this study presents a methodology using XANES and EXAFS at Ca K-edge to
435 study intracellular stable ACC in intact cells of cyanobacteria. Furthermore, our results provide
436 valuable insights into the speciation of Ca in ACC-forming cyanobacteria strains using XANES
437 LCF analysis. The results suggest that between 60-85% of the total calcium in ACC-forming
438 cyanobacteria strains is contained in the ACC phase. Lastly, the Ca coordination environment of
439 cyanobacterial ACC was different than other biogenic stable ACC, suggesting that cyanobacterial
440 ACC is yet another type of ACC polymorph. The local order of cyanobacterial ACC was found to
441 encode a structure similar to that of monohydrocalcite (MHC), similar to other biogenic stable
442 ACC. How the cells impose this structure remains an interesting question for future work.

443 **4. Acknowledgements**

444 We would like to thank the financial support the French Agence Nationale de la Recherche (ANR),
445 under grant ANR-18-CE0-0013-02. We would also like to thank several instrumentation facilities
446 located at L'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC, Paris,
447 France) that enabled streamlines measurement and analysis of datasets presented in this work:
448 Maxime Guillaumet and Keevin Béneut for Spectroscopy platform; Ludovic Delbes and Benoît
449 Baptiste for X-ray diffraction facility; and Cynthia Travert and Ferial Skouri-Panet for GEMME
450 (geomicrobiology) facility. We thank Cécile Bernard and Charlotte Duval from the Paris Museum
451 collection (PMC) for providing PMC strains. Lastly, we thank Pierre Le Pape (IMPMC, Paris,
452 France) for insightful discussions about EXAFS dataset.

453

454 **References**

- 455 [1] B. L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, *Adv. Mater.* **2003**, 959–970.
- 456 [2] I. M. Weiss, N. Tuross, L. Addadi, S. Weiner, *J. Exp. Zool.* **2002**, 293, 478–491.
- 457 [3] Y. Politi, T. Arad, E. Klein, S. Weiner, L. Addadi, *Science.* **2004**, 306, 1161–1164.
- 458 [4] J. Aizenberg, G. Lambert, S. Weiner, L. Addadi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 32–39.
- 459 [5] D. Evans, W. R. Gray, J. W. B. Rae, R. Greenop, P. B. Webb, K. Penkman, R. Kröger, N. Allison,
460 *Geochim. Cosmochim. Acta* **2020**, 290, 293–311.
- 461 [6] L. Gago-Duport, M. J. I. Briones, J. B. Rodríguez, B. Covelo, *J. Struct. Biol.* **2008**, 162, 422–435.
- 462 [7] H. Du, E. Amstad, **2020**, 1798–1816.
- 463 [8] E. Couradeau, K. Benzerara, E. Gérard, D. Moreira, S. Bernard, G. E. Jr. Brown, P. López-García,
464 *Science* **2012**, 336, 459–462.
- 465 [9] K. Benzerara, F. Skouri-Panet, J. Li, C. Ferard, M. Gugger, T. Laurent, E. Couradeau, M. Ragon, J.
466 Cosmidis, N. Menguy, I. Margaret-Oliver, R. Tavera, P. Lopez-Garcia, D. Moreira, *Proc. Natl. Acad.*
467 *Sci.* **2014**, 111, 10933–10938.
- 468 [10] S. Weiner, Y. Levi-Kalisman, S. Raz, L. Addadi, *Connect. Tissue Res.* **2003**, 44, 214–218.
- 469 [11] C. L. Monteil, K. Benzerara, N. Menguy, C. C. Bidaud, E. Michot-Achdjian, R. Bolzoni, F. P. Mathon,
470 M. Coutaud, B. Alonso, C. Garau, D. Jézéquel, E. Viollier, N. Ginet, M. Floriani, S. Swaraj, M. Sachse,
471 V. Busigny, E. Duprat, F. Guyot, C. T. Lefevre, *ISME J.* **2021**, 15, 1–18.
- 472 [12] K. Benzerara, R. Bolzoni, C. Monteil, O. Beyssac, O. Forni, B. Alonso, M. P. Asta, C. Lefevre,
473 *Geobiology* **2021**, 19, 199–213.
- 474 [13] M. Ragon, K. Benzerara, D. Moreira, R. Tavera, P. Lopez-Garcia, *Front. Microbiol.* **2014**, 5, 1–11.
- 475 [14] B. Karim, D. Elodie, B.-F. Tristan, C. Géraldine, C.-C. Corinne, C. Franck, D. Manuela, D. S. Issa, G.
476 Geoffroy, G. Sigrid, G. Muriel, L.-G. Purificación, S.-P. Fériel, M. David, C. Isabelle, *bioRxiv* **2021**,
477 2021.11.01.465933.
- 478 [15] K. Benzerara, E. Duprat, T. Bitard-Feildel, G. Caumes, C. Cassier-Chauvat, F. Chauvat, M. Dezi, S. I.
479 Diop, G. Gaschignard, S. Görgen, M. Gugger, P. López-García, M. Millet, F. Skouri-Panet, D.
480 Moreira, I. Callebaut, *Genome Biol. Evol.* **2022**, 14, 1–16.
- 481 [16] J. Gaëtan, S. Halary, M. Millet, C. Bernard, C. Duval, S. Hamlaoui, A. Hecquet, M. Gugger, B. Marie,
482 N. Mehta, D. Moreira, F. Skouri-Panet, C. Travert, E. Duprat, J. Leloup, K. Benzerara, *Environ.*
483 *Microbiol.* **2022**, 1462-2920.16322.
- 484 [17] N. Cam, K. Benzerara, T. Georgelin, M. Jaber, J. F. Lambert, M. Poinso, F. Skouri-Panet, D. Moreira,
485 P. López-García, E. Raimbault, L. Cordier, D. Jézéquel, *Geobiology* **2018**, 16, 49–61.
- 486 [18] J. Cosmidis, K. Benzerara, *Comptes Rendus Géoscience Planète* **2022**, 34, 1–39.
- 487 [19] N. Cam, K. Benzerara, T. Georgelin, M. Jaber, J. F. Lambert, M. Poinso, F. Skouri-Panet, L. Cordier,
488 *Environ. Sci. Technol.* **2016**, 50, 11654–11662.
- 489 [20] M. Blondeau, K. Benzerara, C. Ferard, J. M. Guigner, M. Poinso, M. Coutaud, M. Tharaud, L.
490 Cordier, F. Skouri-Panet, *Chem. Geol.* **2018**, 483, 88–97.
- 491 [21] N. Mehta, K. Benzerara, B. D. Kocar, V. Chapon, *Environ. Sci. Technol.* **2019**, 53, 12639–12647.
- 492 [22] N. Mehta, J. Bougoure, B. D. Kocar, E. Duprat, K. Benzerara, *ACS EST Water* **2022**, 2, 616–623.
- 493 [23] M. E. Hodson, L. G. Benning, B. Demarchi, K. E. H. Penkman, J. D. Rodriguez-Blanco, P. F. Schofield,
494 E. A. A. Versteegh, *Geochem. Trans.* **2015**, 16, DOI 10.1186/s12932-015-0019-z.
- 495 [24] Y. Levi-Kalisman, S. Raz, S. Weiner, L. Addadi, I. Sagi, *Adv. Funct. Mater.* **2002**, 12, 43–48.
- 496 [25] Y. Politi, R. A. Metzler, M. Abrecht, B. Gilbert, F. H. Wilt, I. Sagi, L. Addadi, S. Weiner, P. U. P. A.
497 Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105, 17362–17366.
- 498 [26] Y. Politi, Y. Levi-Kalisman, S. Raz, F. Wilt, L. Addadi, S. Weiner, I. Sagi, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, 16,
499 1289–1298.

- 500 [27] C. J. Stephens, S. F. Ladden, F. C. Meldrum, H. K. Christenson, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, n/a-n/a.
- 501 [28] E. Loste, R. M. Wilson, R. Seshadri, F. C. Meldrum, *J. Cryst. Growth* **2003**, *254*, 206–218.
- 502 [29] Z. Liu, Z. Zhang, Z. Wang, B. Jin, D. Li, J. Tao, R. Tang, J. J. de Yoreo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- 503 **2020**, *117*, 3397–3404.
- 504 [30] J. Cavanaugh, M. L. Whittaker, D. Joester, *Chem. Sci.* **2019**, 5039–5043.
- 505 [31] M. Blondeau, M. Sachse, C. Boulogne, C. Gillet, J.-M. Guigner, F. Skouri-Panet, M. Poinso, C.
- 506 Ferard, J. Miot, K. Benzerara, *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–14.
- 507 [32] B. Hasse, H. Ehrenberg, J. C. Marxen, W. Becker, M. Epple, *Chem. - Eur. J.* **2000**, *6*, 3679–3685.
- 508 [33] I. M. Weiss, N. Tuross, L. Addadi, S. Weiner, *J. Exp. Zool.* **2002**, *293*, 478–491.
- 509 [34] S. Raz, P. C. Hamilton, F. H. Wilt, S. Weiner, L. Addadi, *Adv. Funct. Mater.* **2003**, *13*, 480–486.
- 510 [35] J. H. E. Cartwright, A. G. Checa, J. D. Gale, D. Gebauer, C. I. Sainz-Díaz, *Angew. Chem. - Int. Ed.*
- 511 **2012**, *51*, 11960–11970.
- 512 [36] S. Kababya, A. Gal, K. Kahil, S. Weiner, L. Addadi, A. Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 990–998.
- 513 [37] S. Weiner, L. Addadi, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2011**, *41*, 21–40.
- 514 [38] J. Li, I. Margaret Oliver, N. Cam, T. Boudier, M. Blondeau, E. Leroy, J. Cosmidis, F. Skouri-Panet, J.-
- 515 M. Guigner, C. Férard, M. Poinso, D. Moreira, P. Lopez-Garcia, C. Cassier-Chauvat, F. Chauvat, K.
- 516 Benzerara, *Minerals* **2016**, *6*, 10.
- 517 [39] F. Caballero-Briones, F. J. Espinosa-Faller, V. Rejón, F. Chalé, E. Hernández-Rodríguez, A. Zapata-
- 518 Navarro, J. L. Peña, *J. Cereal Sci.* **2014**, *60*, 7–10.
- 519 [40] Y. Levi-Kalisman, S. W. Scfi Raz, L. Addadi, I. Sagi, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2000**, 3977–3982.
- 520 [41] A. Becker, U. Bismayer, M. Epple, H. Fabritius, B. Hasse, J. Shi, A. Ziegler, *J. Chem. Soc. Dalton*
- 521 *Trans.* **2003**, *3*, 551–555.
- 522 [42] M. Neumann, M. Epple, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 1953–1957.
- 523 [43] H. Nebel, M. Epple, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2008**, *634*, 1439–1443.
- 524 [44] A. Gaur, B. D. Shrivastava, *Rev. J. Chem.* **2015**, *5*, 361–398.
- 525 [45] J. Avaro, E. M. Moon, J. Rose, A. L. Rose, *Geochim. Cosmochim. Acta* **2019**, *259*, 344–357.
- 526 [46] R. S. K. Lam, J. M. Charnock, A. Lennie, C. Fiona, R. S. K. Lam, J. M. Charnock, F. C. Meldrum, **2007**,
- 527 DOI 10.1039/b710974a.
- 528 [47] L. Monico, L. Cartechini, F. Rosi, W. De Nolf, M. Cotte, R. Vivani, C. Maurich, C. Miliani, *Sci. Rep.*
- 529 **2020**, *10*, 1–14.
- 530 [48] J. Xto, R. Wetter, C. N. Borca, C. Frie, J. A. Van Bokhoven, T. Huthwelker, *RSC Adv.* **2019**, *9*, 34004–
- 531 34010.
- 532 [49] F. M. Michel, J. MacDonald, J. Feng, B. L. Phillips, L. Ehm, C. Tarabrella, J. B. Parise, R. J. Reeder,
- 533 *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 4720–4728.
- 534 [50] D. Gebauer, H. Cölfen, A. Verch, M. Antonietti, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 435–439.
- 535 [51] M. Albéric, L. Bertinetti, Z. Zou, P. Fratzl, W. J. E. M. Habraken, Y. Politi, *Adv. Sci.* **2018**, *5*, 1701000–
- 536 1701000.
- 537 [52] W. Li, X. Liu, Y. Hu, *Geostand. Geoanalytical Res.* **2020**, *44*, 805–819.
- 538 [53] N. Mehta, J. Gaëtan, P. Giura, T. Azaïs, K. Benzerara, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*
- 539 **2022**, *278*, 121262.
- 540 [54] N. Zeyen, K. Benzerara, O. Beyssac, D. Daval, E. Muller, C. Thomazo, R. Tavera, P. López-García, D.
- 541 Moreira, E. Duprat, *Geochim. Cosmochim. Acta* **2021**, *305*, 148–184.
- 542 [55] A. Becker, U. Bismayer, M. Epple, H. Fabritius, B. Hasse, J. Shi, A. Ziegler, *Dalton Trans.* **2003**, 551–
- 543 555.
- 544 [56] S. Sen, D. C. Kaseman, B. Colas, D. E. Jacob, S. M. Clark, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 20330–
- 545 20337.
- 546 [57] A. Gal, W. Habraken, D. Gur, P. Fratzl, S. Weiner, L. Addadi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4867–
- 547 4870.

548 [58] Shuheng Zhang, O. Nahi, Li Chen, Zabeada Aslam, N. Kapur, Y.-Y. Kim, F. C. Meldrum, *Adv. Funct.*
549 *Mater.* **2022**, 2201394–2201394.

550 [59] A. V. Radha, T. Z. Forbes, C. E. Killian, P. U. P. A. Gilbert, A. Navrotsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
551 **2010**, *107*, 16438–16443.

552 [60] M. P. Schmidt, A. J. Illott, B. L. Phillips, R. J. Reeder, *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14*, 938–951.

553

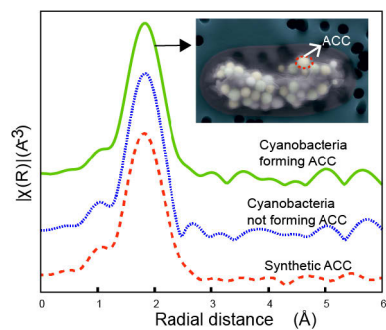
554

555

556

557 Ca K-edge Fourier Transform EXAFS spectra of ACC forming cyanobacteria, non-ACC forming

558 cyanobacteria, and synthetic ACC.



559