Aix*Marseille université
Socialement engagée

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
Le 25 janvier 2024 par

Camille MANGIN

Biominéralisation intracellulaire de phases carbonatées par les bactéries magnétotactiques du lac Pavin

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Microbiologie

École doctorale
ED 62 Sciences de la vie et de la santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
Institut de Biosciences et de Biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM)
UMR 7265- CEA Cadarache

Composition du jury

Corinne BIDERRE-PETIT	Rapporteuse
LMGE, Université Blaise Pascal	
David MOREIRA	Rapporteur
ESE (INRAE/CNRS), Université Paris-Sud	
Gaël ERAUSO	Président du Jury
MIO, Aix-Marseille Université	
Bénédicte MENEZ	Examinatrice
IPGP, Université Paris Cité	
Virginie CHAPON	Examinatrice
BIAM (CEA/CNRS), Aix-Marseille Université	
Karim BENZERARA	Examinateur
IMPMC, Sorbonne Université	
Christopher LEFEVRE	Directeur de thèse
BIAM (CEA/CNRS), Aix-Marseille Université	
Caroline MONTEIL	Co-directrice de thèse
BIAM (CEA/CNRS), Aix-Marseille Université	

BIAM cea cnrs

Affidavit

Je soussignée, Camille MANGIN, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Caroline MONTEIL et Christopher LEFEVRE, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Saint-Paul-Lez-Durance, le 9 juillet 2023

Camille MANGIN.



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participations aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. *Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in magnetotactic Pseudomonadota*. **C.C. Mangin**, K. Benzerara, N. Menguy, S. Fouteau, R. Meheust, B. Alonso, C. Godon, N. Mehta, E. Duprat, C. Travert, R. Bolzoni, F. Skouri-Panet, C. Cruaud, E. Viollier, D. Jézéquel, D. Vallenet, C.T. Lefèvre & C.L. Monteil, **article en preparation pour *ISME J.***

2. *Biomineralization of intracellular Ba-carbonate by magnetotactic sulfate reducing bacteria,* **article en preparation.**

2) Participation aux conférences au cours de la période de thèse :

1. **C.C. Mangin**, K. Benzerara, N. Menguy, R. Bolzoni, B. Alonso, N. Mehta, E. Duprat, C. Travert, F. Skouri-Panet, E. Viollier, D. Jézéquel, C.T. Lefèvre & C.L. Monteil. « Intracellular formation of carbonate phases is a widespread function in magnetotactic bacteria » (2022). Congrès *7th International Meeting on Magnetotactic Bacteria*, 4-8 Septembre 2022, Bayreuth, Allemagne (Communication orale).

2. **C.C. Mangin**, K. Benzerara, N. Menguy, R. Bolzoni, B. Alonso, N. Mehta, E. Duprat, C. Travert, F. Skouri-Panet, E. Viollier, D. Jézéquel, C.T. Lefèvre & C.L. Monteil (2022). « La formation intracellulaire de phases carbonatées est une fonction répandue chez les bactéries magnétotactiques ». 17ème Congrès National de la SFM « Microbes », 3-5 Octobre 2022, Montpellier, France (Présentation poster).

3. N. Mehta, E. Viollier, D. Jézéquel, N. Menguy, E. Duprat, **C.C. Mangin**, C. Travert, C.T. Lefèvre, C.L. Monteil, K. Benzerara. « Mineralogical and Geochemical controls on intracellular amorphous calcium carbonate (ACC) formed by magnetotactic bacteria in Lake Pavin, France ». Congrès *7th International Meeting on Magnetotactic Bacteria*, 4-8 Septembre 2022, Bayreuth, Allemagne (Poster).

4. C.T. Lefèvre, N. Menguy, K. Benzerara, V. Busigny, **C.C. Mangin**, N. Mehta, C. Travert, R. Bolzoni, C. Bidaud, F. Mathon, D. Jézéquel, E. Viollier, F. Skouri-Panet, E. Duprat & C.L. Monteil. « Lake Pavin is a microbial mineralization oasis » Conférence internationale Goldschmidt 2022, https://doi.org/10.46427/gold2022.11850 (Communication orale).

Résumé

De nombreuses espèces minérales sont produites par les êtres vivants. Cependant, la diversité des minéraux et celle des microorganismes qui les biominéralisent sont encore mal connues, tout comme les mécanismes moléculaires et géochimiques qui en sont à l'origine. Récemment, l'étude des sédiments et de la colonne d'eau du lac Pavin (Massif central, France) a révélé un groupe de bactéries capables de biominéraliser des cristaux ferrimagnétiques et des carbonates de calcium amorphes intracellulaires (iACC) dans des conditions environnementales défavorables à leur formation. Alors qu'elle a longtemps été limitée à des groupes de *Cyanobacteria* et de *Gammaproteobacteria,* la carbonatogenèse intracellulaire est alors apparue bien plus répandue que ce que l'on croyait. Une caractérisation plus approfondie des populations magnétotactiques formant des iACC ($_{iACC}$MTB) a donc été réalisée pour en déterminer la diversité spécifique et fonctionnelle, mais également pour comprendre les conditions environnementales de formation des iACC. Des études utilisant une combinaison d'approches de microbiologie environnementale, de génomique, de microscopie et de minéralogie sur des cellules triées par micromanipulation ont révélé de nouveaux groupes de $_{iACC}$MTB au sein des *Pseudomonadota* et *Thermodesulfobacteriota* formant des biominéraux de composition, structure et organisation variées. L'association des carbonates à différents métaux alcalino-terreux montre leur incorporation sélective en fonction des taxa et/ ou niches. De plus, la reconstruction des réseaux métaboliques suggère différentes voies de fixation du CO_2 à l'origine du carbone dans les carbonates et n'exclue pas un lien avec la dégradation des composés en C1 pour les *Alphaproteobacteria*. Ces travaux soutiennent que la carbonatogénèse intracellulaire a évolué de manière convergente et soulève des questions sur ses connections avec le cycle du C, notamment dans les lacs chimiquement stratifiés.

Mots clés : Microbiologie environnementale – biominéralisation – bactéries magnétotactiques – carbonatogenèse.

Abstract

Many mineral species are produced by organisms of all domains of life. However, the diversity of minerals and that of the biomineralizing microorganisms are still poorly understood, together with the molecular and geochemical mechanisms associated with. A recent study of the sediments and water column of Lake Pavin (Massif Central, France) has revealed a group of bacteria capable of biomineralizing intracellular ferrimagnetic crystals and intracellular amorphous calcium carbonates (iACC) under unfavorable environmental conditions to their formation. While it had long been restricted to groups of *Cyanobacteria* and *Gammaproteobacteria*, intracellular carbonatogenesis now appeared much more widespread than previously thought. A more in-depth characterization of magnetotactic iACC-forming populations ($_{iACC}$MTB) was therefore carried out to determine their specific and functional diversity, but also to understand the environmental conditions of iACC formation. Several studies using a combination of environmental microbiology, genomics, microscopy and mineralogy approaches on single-cells sorted by micromanipulation have revealed new MTB groups within *Pseudomonadota* and *Thermodesulfobacteriota* forming carbonate phases of varied composition, structure and organization. The association of carbonates with different alkaline earth metals shows their selective incorporation according to taxa and/or niches. Furthermore, the reconstruction of metabolic networks suggests different CO_2 fixation pathways at the origin of carbon in carbonates, and does not exclude a link with the degradation of C1 compounds for *Alphaproteobacteria*. This work supports the convergent evolution of intracellular carbonatogenesis and raises questions about its connections with the C cycle, particularly in chemically stratified lakes.

Key words: Environmental microbiology – biomineralization – magnetotactic bacteria – carbonatogenesis.

Remerciements

Ce travail a bénéficié d'une aide du gouvernement français au titre de France 2030, dans le cadre de l'Initiative d'Excellence d'Aix-Marseille Université - A*MIDEX et s'inscrit dans le cadre de l'Institut Microbiologie, Bioénergies et Biotechnologie – IM2B (AMX-19-IET-006). Ce travail a été soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (CarboMagnet : ANR-21-CE01-0010 ; ANCESMAG ANR-20-CE92-0050 ; et PHOSTORE : ANR-19-CE01-0005), le CNRS : « Programme National Ecosphère Continentale et Côtière (EC2CO) » (Projet BACCARAT2 – N°13068). Je remercie l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) du CEA Cadarache pour l'accès au microscope électronique à transmission Tecnai G2 BioTWIN. Je remercie également la plateforme de bioinformatique INRA MIGALE (http://migale.jouy.inrae.fr) pour la fourniture de ressources informatiques. Enfin, un grand merci à la ville de Besse pour les facilités de travail sur le terrain, et particulièrement Marie Léger du service patrimoine ainsi que Corinne Mestas et le staff technique.

Une thèse de doctorat est une expérience professionnelle et humaine vraiment hors du commun ainsi qu'un long voyage vers l'apprentissage de soi-même. Si je devais illustrer ce magnifique périple, je prendrai tout bonnement comme exemple l'histoire de *Bilbon Sacquet* (i.e. *personnage de fiction apparaissant dans l'œuvre de J. R. R. Tolkien*), un petit Hobbit inexpérimenté vivant confortablement dans sa Comté, qui décide de partir à l'aventure avec le magicien Gandalf et les treize nains dans les profondes contrées de la Terre du Milieu.

Me voilà donc jeune Hobbit de la Comté, tiraillée entre deux volontés très ambivalentes. La première est une vie confortable, sécurisante, basée sur les plaisirs immédiats et montrant beaucoup de crainte et méfiance pour l'extérieur et l'inconnu, avec ce besoin de sécurité et d'immuabilité. La seconde est un désir profond d'évolution personnelle vers une attitude plus mature, plus concernée, plus risquée soulignant la volonté de sortir de sa zone de confort. J'ai donc choisi d'entreprendre cette longue traversée vers la *Montagne Solitaire* à *Erebor*, remplie de richesses, ressources et péripéties, non sans embûches, mais avec de multiples occasions de grandir.

Ce voyage a débuté par la rencontre de deux magiciens. Tous deux vêtus d'une cape blanche, ils semblaient avoir parcouru déjà de nombreux périples et me paraissaient expérimentés, passionnés et d'une certaine façon, bienveillants et sécurisants. Ces aventuriers, Caroline et Christopher, étaient à la quête d'un nouveau membre pour les accompagner dans leur excursion scientifique. Leurs explorations portaient sur la découverte d'êtres-vivants microscopiques avec des propriétés magnétiques impressionnantes. De nature curieuse et très intriguée par les mystères de la science, j'ai tout de suite exprimé mon intérêt d'étudier ces fascinantes créatures microscopiques.

Leurs récits contaient l'histoire d'un lac volcanique sur notre destination, rempli de mystères et de nombreuses légendes. Nommé « lac Pavin », son nom proviendrait du latin *pavens*, signifiant « épouvantable » et semblait être à l'origine de fabuleuses découvertes. C'est à cet endroit précis que vivaient ces incroyables microorganismes magnétotactiques. Séduits par ces Terres inexplorées et cette fascinante diversité, les deux mages et le jeune Hobbit se lancèrent dans l'aventure…

A travers ces lignes, j'aimerai exprimer mes plus sincères remerciements aux personnes qui ont contribué, de près comme de loin, à cette aventure de ma vie.

Je souhaite en tout premier lieu remercier David Pignol pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'Institut de Biosciences et de Biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM). Je tiens à remercier sincèrement les membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse. Merci à Dr. Corinne Biderre-Petit, Dr. Bénédicte Menez, Dr. Virginie Chapon, Dr. Gaël Erauso, Dr. David Moreira et Dr. Karim Benzerera, pour l'enthousiasme dont vous avez fait preuve concernant l'évaluation de ce projet de thèse. Mes remerciements se tournent également auprès des membres de mon comité de suivi de thèse qui ont accepté de m'aider dans cette aventure : Dr. Matthieu Amor, Dr. Karim Benzerara, Dr. Guillaume Borrel, Dr. Julie Cosmidis, Dr. Gaël Erauso.

Je remercie très chaleureusement mes deux directeurs de thèse, Christopher Lefèvre et Caroline Monteil de m'avoir accordé leur confiance pour cette aventure. C'est une chance d'avoir eu un projet de thèse avec des campagnes d'échantillonnage et beaucoup de terrain, surtout avec un aussi beau cadre que celui du lac Pavin. Merci de m'avoir choisie pour ce projet de thèse interdisciplinaire, à l'interface de la microbiologie et de la géochimie, au sein d'une équipe vraiment agréable et bienveillante.

Christopher, un grand merci d'avoir pris le temps de me former et de m'accompagner pour chacune des expérimentations qui demandent une certaine patience et beaucoup de dextérité. Merci de ta disponibilité constante et de ton dévouement pour tes doctorants. J'ai beaucoup apprécié nos échanges et moments partagés ensemble. Je me souviendrai toujours de cette première campagne d'échantillonnage à Beaulieu-Sur-Dordogne, où j'ai partagé mon trajet de voiture avec un joli coq. C'est à ce moment-là que j'ai su que j'avais atterri dans la bonne équipe. Depuis ce jour-là est née la *Techno Chicken* et d'innombrables jeux de mots dans l'Univers de *Chicken Run*. Merci pour ces moments. Avant de commencer ma thèse, j'avais déjà un intérêt très prononcé pour la microscopie et toutes les méthodes d'analyse associées… En quittant cette aventure, j'apprécie encore plus cette spécialité. L'émerveillement est au bout du microscope ! Un grand merci de m'avoir proposé un large panel d'outils microscopiques durant ma thèse.

Caroline, un immense merci pour ton aide précieuse, tant sur le plan humain que professionnel. Au-delà de m'avoir partagé tes nombreuses connaissances scientifiques, tu m'as appris à réfléchir, écrire et penser comme un apprenti chercheur. Plus le temps passe

et plus j'ai des questions buissonnantes à propos de mon sujet de thèse. Alors un grand merci d'avoir cru en moi quand moi-même je n'y croyais pas. J'ai très souvent eu un regard imparfait sur mes propres accomplissements durant ces trois années. Grâce à toi, j'ai appris à regarder tout ce que j'ai pu accomplir dans ce projet, au lieu de prêter attention à tout ce que je n'ai pas pu réaliser. Merci pour ton soutien moral quand il n'était pas au rendez-vous. J'ai toujours su que tu étais mon alliée, dans les pires comme dans les meilleurs moments. Je n'oublierai pas ton implication et ton dévouement infaillible pour tes doctorants. Merci de m'avoir accompagnée tout le long de cette aventure et de m'avoir aidée à grandir.

Je remercie infiniment toute notre équipe de collaboration. Un grand merci à l'équipe de l'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC). Merci de votre gentillesse et de votre aide précieuse. J'ai apprécié chacun de nos échanges et c'était un réel plaisir de rentrer dans l'univers de la minéralogie et de la géomicrobiologie. Merci Karim Benzerara et Nicolas Menguy pour ces magnifiques images de microscopie MEB et MET et pour toutes les autres analyses chimiques durant ma thèse. Merci Elodie Duprat pour ces beaux profils de distribution des MTB et pour ton aide. Un grand merci à Fériel Skouri-Panet, Cynthia Travert et Neha Mehta pour votre accueil chaleureux à l'IMPMC en Mars 2021 pendant ces deux semaines, et pour toutes vos explications et analyses, qui m'ont grandement aidé à débuter ma thèse dans de bonnes conditions. Un grand merci à l'équipe de l'Institut de physique du globe de Paris (IPGP). Merci Didier Jezequel de retranscrire ta passion pour le lac Pavin, toutes tes explications m'ont été d'une grande aide à la compréhension de cet environnement si particulier. Un grand merci à Eric Viollier, Vincent Busigny, Emmanuelle Raimbault qui ont également participé à tous les prélèvements et analyses chimiques sur le lac. Merci Eric pour tes explications et ton partage de connaissances pour échantilloner des carottes de sédiments. Je tiens également à remercier David Vallenet et Raphael Meheust de l'équipe Laboratoire d'Analyses Bioinformatiques pour la Génomique et le Métabolisme (LABGeM) pour votre aide précieuse lors des dernières missions ainsi que pour les analyses de génome. Enfin, un énorme merci à tous ceux / toutes celles qui ont pu venir aux différentes campagnes d'échantillonnage pour votre aide physique et contribution aux différentes analyses.

Mes remerciements s'étendent également à l'ensemble du personnel de l'Université de Clermont-Ferrand (UCA) pour leur accueil dans la station biologique de Besse-et-Saint-Anastasie. Merci à Corinne et à Sylviane pour vos nombreux accueils chaleureux. Mais surtout…un grand merci à toute l'équipe du restaurant « Le Bessoi » d'avoir éveillé à coup sûr mes *papilles gustatives* pendant toutes nos missions.

Mes remerciements se tournent désormais auprès de l'équipe BEAMM. Béatrice Alonso, un immense merci de ton aide précieuse dans les protocoles de biologie

moléculaire et des coupes fines, et de ta disponibilité bienveillante. C'était un plaisir de travailler à tes côtés, tu as toujours le sourire, ne changes rien ! Merci Philippe Ortet pour tes blagues et ta bonne humeur. Un grand merci Marine Bergot pour tes compétences et ton aide précieuse dans les analyses de génomes ainsi que dans la construction des arbres phylogénomiques. Toi qui avais peur de t'ennuyer… Dédicaces aux futures et futurs doctorant(e)s, Elsa, Emilie, et Louison. Je remercie également Romain Bolzoni pour les données acquises pendant ses stages de Master, notamment les belles images de microscopie.

Mes remerciements s'adressent également à Christian Godon de m'avoir formée à la microscopie confocale à fluorescence et pour ses nombreuses explications sur le mode spectral. C'était un réel plaisir de partager ces moments et d'observer (avec beaucoup d'excitation) mes lames de microscopie pour les analyses FISH.

Un grand merci à Daniel Chevrier pour ton aide précieuse dans les analyses réalisées au synchrotron XAS, ta bonne humeur et nos discussions autour de la machine à café. Grâce à toi, je me sens beaucoup moins addicte au café.

Je dédicace une mention très spéciale à mes collègues de cœur, qui ont grandement contribué à cette aventure. Je souhaite adresser mes sincères remerciements à Elsa Turrini. Un premier grand merci pour ton aide scientifique précieuse dans le projet de culture et tes connaissances sur les métabolismes des MTB. Merci pour l'aquisition de toutes ces données, ton esprit d'équipe, et pour ton implication dans ce projet. Un deuxième merci sur le plan humain, tu as été un réel soutien, notamment lors de ma dernière année de thèse. Je me souviendrai de nos interminables discussions philosophiques et nos moments de fou-rires (« *écoute ce style, écoute mon style* »). Mes remerciements se tournent vers Océane Reille. C'est un plaisir d'avoir partagé tous ces moments le long de cette aventure. Tes passions pour l'art, le dessin, et ta gentillesse ont beaucoup apporté dans cet Institut. Pensées pour Alicia, Emma, Emilie et Tolotra et pour nos moments de partage et de rire.

J'adresse une pensée pour tous les autres membres du BIAM avec qui j'ai passé de très bons moments, Yeseul, Maureen, Léa, Clotilde, Tiffanie, Carla. Merci à ma première collègue de bureau, Géraldine B, pour nos nombreuses discussions autour de voyages et de la vie, c'était un plaisir de partager ces instants. Je remercie également toute l'équipe du MEM pour les bons moments partagés ensemble. Merci également à toutes les autres personnes du BIAM avec qui j'ai pu partager des échanges sympathiques.

Un grand merci à mes encadrants de stage de Master au Laboratoire MAPIEM, qui finalement, qui m'ont menée sur la voie de la recherche. Merci Maelle Molmeret de m'avoir permis de participer à un projet de recherche sur les interactions amibes-bactéries. Je remercie chaleureusement Annick Ortalo-Magné, Gérald Culioli et Nathan Carriot de m'avoir proposé un stage de Master 2 à l'interface microbiologie-chimie, me

permettant de découvrir un panel de techniques chromatographiques et spectroscopiques.

Mes remerciements se tournent désormais vers la Société Française de Microbiologie (SFM) et plus particulièrement au groupe Réseau des Jeunes Microbiologistes Fondamentalistes (ReJMiF). Merci Gaëtan Ligat de m'avoir intégré dans ce groupe de travail bienveillant et hyper enrichissant. J'ai pu faire de magnifiques rencontres, dont Typhaine Brual et de nombreuses autres personnes. L'organisation du congrès Microbes en 2022 était vraiment une incroyable expérience ! Merci aux autres membres de la JM-SFM. Je vous adore, j'ai passé d'excellents moments à vos côtés et je continuerai autant que possible à m'impliquer dans les futurs projets.

Enfin, le plus important, je souhaite exprimer mes plus sincères remerciements à ma famille et à mes proches qui, sans s'en apercevoir, ont énormément contribué à ce travail. Merci Maman, Papa, Mamie, Papy, Tatie et Tonton. Quelques mots ne suffiront pas à exprimer toute ma gratitude, ma reconnaissance et mon amour envers vous. Votre soutien sans faille a beaucoup compté pour moi. Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait et faites encore pour moi. Merci pour vos encouragements et votre immense amour.

Je souhaite également remercier du fond du cœur celui qui partage mon quotidien, Antoine. Merci de m'avoir encouragée dans tout ce que j'ai eu envie d'entreprendre, de m'avoir soutenue dans toutes les épreuves et supporté mes états d'âme. Merci pour ta bonne humeur et tes pensées positives, qui m'accompagnent au quotidien et m'accompagneront encore longtemps je l'espère.

Une énorme pensée pour ma Nunute, au paradis des animaux et qui m'a quittée beaucoup trop tôt. Une petite boule d'amour de deux ans seulement, mais deux années remplies de joie. « Tu n'es plus là où tu étais, mais tu es partout là où je suis ». Une dernière pensée aux magnifiques rencontres que j'ai pu faire sur Manosque et dans ce beau département.

« *Cela semble toujours impossible jusqu'à ce qu'on le fasse* »
Nelson MANDELA

« *Le plus grand voyageur n'est pas celui qui a fait dix fois le tour du monde, mais celui qui a fait une seule fois le tour de lui-même* »
GHANDI

Liste des abréviations et acronymes

Les acronymes représentent des expressions en anglais données entre parenthèses et traduites en français.

AEM : Métaux alcalino-terreux (*Alkaline Earth Metals*)
DAPI : 4′,6-diamidino-2-phenylindole
DIC : Carbone inorganique dissous (*Dissolved Inorganic Carbon*)
DOC : Carbone organique dissous (*Dissolved Organic Carbon*)
EELS : Spectroscopie de perte d'énergie des électrons (*Electron energy loss spectroscopy*)
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
EPS : Substance polymérique extracellulaire (*Extracellular Polymeric Substance*)
FISH : Hybridation *in situ* en fluorescence (*Fluorescence In Situ Hybridization*)
$_{iACC}$B : Bactérie(s) formant des inclusions de carbonates de calcium amorphes intracellulaires
$_{iABC}$MTB : Bactérie(s) magnétotactique(s) formant des inclusions de carbonates de baryum amorphes intracellulaires
$_{iACC}$MTB : Bactérie(s) magnétotactique(s) formant des inclusions de carbonates de calcium amorphes intracellulaires
iABC : Carbonate de baryum amorphe intracellulaire (*intracellular Amorphous Barium Carbonate*)
iACC : Carbonate de calcium amorphe intracellulaire (*intracellular Amorphous Calcium Carbonate*)
ICP : Plasma à couplage inductif (*Inductively Coupled Plasma*)
HGT : Transferts horizontaux de gène (*Horizontal Gene Transfer*)
MO : Microscopie optique
MTB : Bactérie(s) magnétotactique(s) (*Magnetotactic bacteria*)
MTBc : Bactérie(s) magnétotactique(s) en forme de coccus
ME : Microscopie électronique
MEB : Microscopie électronique à balayage
MET : Microscopie électronique en transmission
OATZ : Zone de transition oxique-anoxique (*Oxic-Anoxic Transition Zone*)
OTU : Unité taxonomique opérationnelle (*Operational Taxonomic Unit*)
PBS : Tampon phosphate salin (*Phosphate Buffer Saline*)
ROS : Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species)*
SAG : Génome unique amplifié (*Single Amplified Genome*)
MAG : Génomes assemblés par métagénome (*Metagenome-Assembled Genomes*)
SRB : Bactéries sulfato-réductrices (*Sulfate-reducing Bacteria*)
STEM : Microscopie électronique en transmission à balayage (*Scanning transmission electron microscopy*)
UVR : Rayonnement ultra-violet (*Ultra-Violet Radiation*)
WGA : Amplification du génome entier (*Whole Genome Amplification*)
XEDS : Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*)

XRD : Diffraction des rayons X (*X-Ray Diffraction*)

Table des matières

Affidavit 0
Liste de publications et participations aux conférences 1
Résumé 2
Abstract 3
Remerciements 4
Liste des abréviations et acronymes 10
Table des matières 11
Introduction générale 15
Préambule 21
Synthèse bibliographique 23
1. Introduction au concept de la biominéralisation microbienne 23
1.1. Généralités et définitions 23
1.1.1. Biominéralisation influencée ou induite 24
1.1.2. Biominéralisation contrôlée 25
1.2. Diversité des minéraux amorphes et cristallins 27
1.3. Diversité des biominéraux au sein du vivant 28
1.3.1. La biominéralisation par les macro-organismes eucaryotes 29
1.3.2. La biominéralisation par les micro-organismes eucaryotes 30
1.3.3. Exemples de biominéralisation par les procaryotes 34
1.3.3.1. Biominéraux extracellulaires 35
1.3.3.2. Biominéraux intracellulaires 38
1.4. Rôle des biominéraux dans le fonctionnement et l'adaptation des microorganismes 39
2. Les bactéries magnétotactiques (MTB) : un cas de biominéralisation intracellulaire et contrôlée 41
2.1. Premières observations 41
2.2. La magnétoréception chez le vivant 42
2.3. Magnétotaxie et niches écologiques 44
2.4. Diversité morphologique, phénotypique et métabolique 48
2.5. Rôle adaptatif et scénarios sur l'histoire évolutive de la magnétotaxie 54
2.6. Bases génétiques et fonctionnelles de la formation des magnétosomes 56
2.7. Diversité des autres structures intracellulaires par les MTB 60
3. La biominéralisation des carbonates par les bactéries 63
3.1. Le cas particulier des cyanobactéries formant des microbialites 64
3.2. Diversité des bactéries formant des carbonates intracellulaires 66
3.2.1. Biominéralisation de larges inclusions d'ACC par *Achromatium* spp. 67
3.2.2. Biominéralisation d'iACC par les cyanobactéries 68
3.2.3. Biominéralisation d'iACC par un groupe de bactéries magnétotactiques 70
3.3. Hypothèses sur le rôle biologique des phases carbonatées intracellulaires 72
3.4. Mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans la formation des phases carbonatées 73
3.5. Les voies métaboliques possibles d'incorporation du carbone dans les carbonates chez les iACCB 74

3.5.1. Généralités sur le métabolisme bactérien ... 74
3.5.2. Les voies de fixation du carbone inorganique ... 77
3.5.3. Le CO_2 : un produit de la méthanotrophie et méthylotrophie ... 84
3.6. Les carbonates dans le cycle du carbone et des métaux alcalino-terreux ... 85
Description du lac Pavin, un site modèle pour l'étude des bactéries vivant à l'interface oxique-anoxique ... 87
1. Présentation générale et historique ... 87
2. Origine volcanique et méromicticité ... 89
3. Caractéristiques de la colonne d'eau du lac Pavin ... 90
3.1. Géochimie de la colonne d'eau du lac Pavin ... 90
3.2. Diversité taxonomique et fonctionnelle des communautés procaryotiques de la colonne d'eau du lac Pavin ... 96
3.3. Diversité taxonomique et fonctionnelle des autres microorganismes de la colonne d'eau du lac Pavin ... 103
4. Caractéristiques des sédiments et de l'eau interstitielle ... 106
4.1. Minéralogie et géochimie des sédiments du lac Pavin ... 106
4.2. Etudes microbiologiques ... 108
Méthodologies ... 112
1. Stratégie expérimentale de la thèse ... 112
2. Echantillonnage des sédiments et de la colonne d'eau du lac Pavin ... 114
2.1. Echantillonnage des MTB dans les sédiments du lac Pavin et analyses géochimiques associées ... 114
2.1.1. Echantillonnage des sédiments peu profonds du lac Pavin ... 115
2.1.2. Echantillonnage des sédiments profonds du lac Pavin ... 117
2.1.3. Analyse géochimique de l'eau interstitielle et des sédiments ... 118
2.2. Echantillonnage des MTB dans la colonne d'eau du lac Pavin et analyses géochimiques associées ... 120
2.2.1. Echantillonnage des MTB de la colonne d'eau ... 120
2.2.2. Analyse géochimique de la colonne d'eau ... 121
3. Concentration et purification des organismes magnétotactiques ... 123
3.1. Enrichissement magnétique et observations en microscopie optique ... 123
3.2. Quantification des populations de MTB dans les sédiments ... 125
3.2.1. Comptage des cellules de MTB dans les sédiments peu profonds ... 125
3.2.2. Comptage des cellules de MTB dans les carottes de sédiment profond (20 m) ... 126
3.3. Tri des MTB par micromanipulation ... 127
4. Identification des $_{iACC}$MTB ... 128
4.1. Introduction à la classification actuelle et son évolution ... 129
4.1.1. Notion d'espèce chez les bactéries ... 129
4.1.2. Avènement de l'ADN ... 129
4.1.3. Choix méthodologique et description de la diversité ... 131
4.2. Analyse de la diversité spécifique des $_{iACC}$MTB par des outils moléculaires ... 132
4.2.1. Amplification du génome entier (WGA) ... 132
4.2.2. Séquençage de l'ARNr 16S ... 133
4.2.3. Authentification de l'ARNr 16S par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) ... 134

5. Caractérisation de l'ultrastructure des bactéries et des structures internes 136

5.1. Microscopie électronique en transmission (MET) 136

5.2. Coupes ultra-fines par ultramicrotomie 137

5.3. Microscopie électronique à balayage (MEB) 138

6. Méthodes de caractérisation des biominéraux 138

6.1. Présentation générale des techniques utilisées pour la caractérisation de biominéraux 138

6.2. Identification de la composition chimique des carbonates amorphes par des analyses chimiques couplées au TEM/STEM 140

6.3. Identification de la structure minéralogique des magnétosomes par des analyses de diffraction au HRTEM 141

6.4. Spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) 141

7. Génomique et phylogénie moléculaire 143

7.1. Séquençage du génome entier à partir d'une seule cellule 143

7.1.1. Annotation fonctionnelle des génomes 144

7.1.2. Reconstruction phylogénétique 145

Chapitre I : Étude de la diversité des *Pseudomonadota* magnétotactiques formant des carbonates de calcium dans le lac Pavin 147

1. Observation et quantification des populations de iACCMTB dans le sédiment et la colonne d'eau 148

1.1. Exploration des communautés de MTB dans les sédiments et visualisation des iACCMTB 148

1.2. Quantification des populations de iACCMTB dans les sédiments 151

1.3. Quantification des populations de iACCMTB dans la colonne d'eau 152

2. Classification des populations de iACCMTB 154

3. Etude de la diversité des morphotypes de iACCMTB-*like* dans le sédiment 156

3.1. Observation de différents morphotypes 156

3.2. Ultrastructure des morphotypes dominants 158

3.2.1. Morphologie, nage et inclusions 158

3.2.2. Composition chimique des biominéraux 167

4. Caractérisation des iACCMTB de la colonne d'eau 169

5. Identification et classification taxonomique des iACCMTB de chaque morphotype 171

5.1. Séquençage de l'ADNr 16S et recherche de similarités avec des espèces connues 171

5.2. Validation des identités par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) 175

5.3. Séquençage des génomes des 5 morphotypes de iACCMTB 177

5.4. Distribution phylogénétique des iACCMTB au sein des *Pseudomonadota* 178

5.4.1. Diversité des iACCMTB au sein des *Azospirillaceae* 179

5.4.2. Diversité des iACCMTB au sein des *Gammaproteobacteria* 184

6. Bases génomiques et fonctionnelles de la formation des biominéraux 191

6.1. Annotation et synténie des clusters de gènes associés à la formation des magnétosomes 191

6.2. Analyse du métabolisme et identification des types trophiques des iACCMTB 196

6.2.1. Sources d'énergie et accepteurs d'électrons 198

6.2.2. Métabolisme des carbohydrates 199

6.2.3. Voies de fixation du carbone inorganique et utilisation des composés en C1 199
6.2.4. Recherche de gènes fonctionnels associés avec la concentration/transport de métaux alcalinoterreux 200
7. Résumé des résultats principaux 201
Chapitre II : Découverte des *Thermodesulfobacteriota* magnétotactiques formant des carbonates de baryum 204
1. Contexte de la découverte 204
2. Ultrastructure des principales populations de iAXCMTB 204
2.1. Morphologie, nage et inclusions 204
2.2. Chimie et morphologie des inclusions de carbonate et des magnétosomes 207
2.3. Recherche d'une membrane entourant les minéraux 212
3. Abondance des iABCMTB dans les sédiments 213
4. Diversité génétique des iABCMTB 213
5. Observation d'autres *Thermodesulfobacteriota-like* formant des iACC dans les sédiments du lac Pavin 215
6. Résumé des résultats principaux 217
Chapitre III : Étude de la niche écologique des bactéries magnétotactiques formant des carbonates intracellulaires 218
1. Introduction 218
2. Niche biogéochimique associée à la présence des iACCMTB dans la colonne d'eau du lac Pavin 219
3. Niche biogéochimique associée à la présence des iAXCMTB dans les sédiments du lac Pavin 222
4. Identification des milieux aquatiques propices à la présence de iACCB 228
4.1. Observation de populations de iACCB non magnétotactiques dans la zone oxique des sédiments profonds 228
4.2. Observation de iACCMTB dans une zone humide et acide 231
4.3. Exploration d'autres milieux aquatiques 234
5. Résumé des résultats principaux 237
Chapitre IV: Recherche de souches cultivées formant des inclusions de carbonate de calcium 238
1. Contexte de l'étude 238
2. Bilan de la recherche bibliographique et sélection des souches types 239
2.1. Analyses préliminaires sur la recherche d'iACC chez les souches types 242
Discussion générale 245
Conclusion générale 268
Perspectives 269
Bibliographie 272
Annexe 1 303
Annexe 2 307
Annexe 3 313

Introduction générale

Bien qu'ils soient pour la plupart invisibles à l'œil nu, les microorganismes représentent une composante majeure au sein de la biosphère et contribuent à une fraction importante de la biodiversité (Cosmidis and Benzerara, 2022). Par ailleurs, en raison de leurs fonctions métaboliques très diversifiées et de leur abondance, ils sont décrits comme des moteurs importants du fonctionnement global des écosystèmes de par leur interaction avec leur environnement biotique et abiotique (Falkowski et al., 2008). Certains les qualifient même d'acteurs « géoactifs » dans notre biosphère, car ils peuvent participer aux (i) réactions de biotransformation des éléments et des cycles géochimiques, aux (ii) transformations des métaux et des minéraux et à la (iii) formation des sols et des sédiments (Gadd, 2010). Rétroactivement, ces interactions à l'interface minéral-vivant peuvent affecter la biodisponibilité des éléments, y compris celle des métaux, dont dépendent les microorganismes pour leur croissance, leur activité ou leur survie (Berenjian and Seifan, 2022). Ainsi, il existe une importante relation microorganismes – environnement géochimique en constante évolution.

Les métaux, qu'ils soient alcalino-terreux ou de transitions, sont des composés impliqués dans presque tous les processus biologiques. Certains d'entre eux sont des micronutriments essentiels à la vie et soutiennent le développement des microorganismes lorsqu'ils sont à l'état de trace, tandis qu'ils deviennent toxiques au-delà de certaines concentrations. D'autres sont toxiques même à l'état de trace alors que d'autres peuvent être tolérés en grande quantité dans la cellule. C'est pourquoi, les microorganismes ont développé au cours des temps géologiques, des stratégies pour contrôler l'homéostasie des métaux ; leur absorption, leur séquestration et leur utilisation. Ces stratégies n'impliquent pas seulement des métalloprotéines mais certains procaryotes ont acquis des capacités à former des minéraux dans leur cellule, leur périplasme ou l'espace extracellulaire par un processus appelé biominéralisation (Bazylinski and Frankel, 2003). La biominéralisation est classée selon le degré de contrôle biologique par rapport à celui de la chimie ; elle est soit (i) génétiquement régulée et contrôlée (i.e. par la production de protéines capables de nucléer et de faire croître des minéraux) soit (ii), simplement passivement induite par l'activité métabolique ayant créé un environnement chimique local favorable (Gadd, 2010; Görgen et al., 2020).

Aujourd'hui, de nombreuses espèces microbiennes, synthétisant une large diversité de minéraux bien identifiés, ont été caractérisées. Un des exemples les plus connus chez les eucaryotes unicellulaires est celui des Coccolithophoridés. En effet ces microalgues peuvent former leur propre structure minérale externe constituée de plusieurs plaques de $CaCO_3$ (i.e coccolithes) assemblées en sphère autour de la cellule (Brownlee et al., 2021). Un deuxième exemple bien connu est celui des tapis microbiens photosynthétiques induisant la précipitation de roches enrichies en $CaCO_3$ appelées microbialites (Riding,

2011). A noter que la découverte de biominéralisation par les procaryotes a été plus tardive que celle des eucaryotes. A l'heure actuelle, le nombre de groupes bactériens découverts capables de biominéralisation a grandi de manière exponentielle et ces études soulignent une grande diversité de biominéraux dont la composition et la structure chimique peuvent être très variées (Görgen et al., 2020). De manière non exhaustive, certains microorganismes peuvent biominéraliser de l'argile, de la silice (SiO_2), des oxyhydroxydes de Fe (III), de la magnétite (Fe_3O_4), des sulfures de fer tels que la greigite (Fe_3S_4), la pyrrhotite (Fe_7S_8), la mackinawite (FeS), la pyrite (FeS_2 cubique), ou la marcasite (FeS_2 orthorhombique), des sulfures de Ni, Cu, Zn, As, Cd, des phosphates de Fe, du soufre élémentaire, ainsi que des carbonates (Cosmidis and Benzerara, 2022; Park and Faivre, 2021). La majorité de ces biominéraux se forment de manière extracellulaire, mais il existe des cas de formation intracellulaire ou périplasmique (Park et al., 2022).

Mesurer la biodiversité de ces organismes, comprendre les mécanismes de formation des minéraux et caractériser leur impact sur les cycles biogéochimiques, est d'intérêt majeur en biologie afin de comprendre non seulement (i) comment le vivant se complexifie, mais également (ii), dans quelle mesure certains groupes de microorganismes représentent d'éventuels réservoirs de carbone, phosphore, azote, ou de métaux, et participent au fonctionnement global des écosystèmes. Au-delà de ces aspects fondamentaux, caractériser des microorganismes capables d'accumuler et de stocker en quantité élevée des éléments chimiques tels que le carbone, le phosphate, le fer et d'autres métaux, peut représenter un atout majeur dans certains secteurs de la biotechnologie, notamment pour des approches de bioremédiation ou pour la recherche médicale.

Bien que plusieurs procaryotes aient développé des mécanismes pour nucléer et faire croître divers minéraux, seuls quelques cas de biominéralisation contrôlée intracellulaire ont été rapportés chez les procaryotes. L'étude de ce pan de la diversité des organismes formant des minéraux a longtemps été limitée par (1) le développement des technologies permettant d'observer et caractériser des minéraux de taille nanométrique, (2) les techniques d'isolement et de purification des microorganismes dont la cultivabilité et la formation de biominéraux en culture restent un challenge et (3), les interprétations sur la nature des corps cellulaires qui peuvent passer inaperçus lors des premières observations au microscope optique ou confondues avec des inclusions de nature organique. Cependant, les avancées technologiques relativement récentes de ces deux dernières décennies, notamment sur les outils de spectroscopie et microscopie dont les analyses à haute résolution, ont grandement participé à la découverte progressive de cette diversité de biominéraux synthétisés et a permis de les caractériser.

Le cas le plus emblématique de biominéralisation contrôlée intracellulaire est celui réalisé par les bactéries magnétotactiques (MTB) (Blakemore, 1975). Ces bactéries

ubiquistes des environnements aquatiques chimiquement stratifiés produisent des magnétosomes, des organites composés de cristaux ferrimagnétiques entourés d'une bicouche lipidique (Uebe and Schüler, 2016). Le déterminisme génétique sous-jacent, la machinerie moléculaire, le rôle écologique et l'évolution de cette voie de biominéralisation ont fait l'objet de recherches interdisciplinaires et représentent le cas le plus documenté de biominéralisation chez les procaryotes (Uebe and Schüler, 2016). Les MTB sont très étudiées notamment grâce à leurs propriétés magnétiques et leur potentielle application dans la recherche médicale (i.e. développement d'agents thérapeutiques, administration de médicaments, thérapie anticancéreuse, biocapteurs). Ces nanocristaux confèrent un moment magnétique aux cellules permettant aux cellules de s'aligner le long des lignes de champ magnétique guidant leur chimio-aérotactisme et leur mobilité sur un axe vertical facilitant ainsi la recherche de leur niche écologique (Bazylinski and Williams, 2007; Bazylinski et al., 1993; Koziaeva et al., 2020; Li et al., 2021). Outre la biominéralisation des magnétosomes, certaines MTB ont également été observées avec des structures intracellulaires accumulant des éléments tels que le phosphore, le soufre, le calcium et/ou la silice [e.g. (Li et al., 2021; Taoka et al., 2014)].

En 2021, un article publié dans mon laboratoire d'accueil décrivait un cas de double biominéralisation chez une nouvelle MTB, appartenant à la classe des *Alphaproteobacteria*, pouvant non seulement fabriquer des magnétosomes, mais également des inclusions de carbonate de calcium amorphes (Monteil et al., 2021). Cette découverte a soulevé plusieurs questions sur la carbonatogenèse intracellulaire car cette biominéralisation est beaucoup moins documentée. Jusqu'à récemment, uniquement deux grands groupes phylogénétiques avaient été décrits comme étant capables de cette forme de biominéralisation. Historiquement, ce sont certaines espèces de la classe des *Gammaproteobacteria*, dont la bactérie sulfureuse géante *Achromatium oxaliferum,* qui ont été décrites pour la première fois en 1893 par Schewiakoff (Schewiakoff W, 1893). Ayant la particularité de posséder un corps cellulaire géant (i.e. taille allant de 15 à plus de 100 µm) (Schorn et al., 2020), la découverte de cette bactérie fut facilitée et est la première à avoir été décrite. Elle accumule de nombreuses inclusions de carbonate de calcium qui remplissent la majeure partie du volume cellulaire (Salman et al., 2015). Ce groupe de bactéries a été observé dans le monde entier dans la zone micro-oxique et anoxique de l'interface sédiments-eau des environnements d'eau douce et marins. Le deuxième groupe capable de cette biominéralisation est celui des cyanobactéries (*Cyanobacteriota/Melainabacteria*), dont certaines espèces telles que les bactéries appartenant à l'ordre des *Gloeobacterales* biominéralisant des inclusions de carbonate de calcium (Couradeau et al., 2012). Suite à sa description chez *Gloeomargarita lithophora*, la biominéralisation de carbonate de calcium amorphe intracellulaire (iACC) par les cyanobactéries a été observée chez d'autres espèces de l'ordre des *Pseudanabaenales* et *Chroococcales*, notamment chez, *Synechococcus sp.*, *Synechocystis sp*., *Neosynechococcus*

sphagnicola (Blondeau et al., 2018b; Cosmidis and Benzerara, 2022), *Thermosynechococcus elongatus* (Benzerara et al., 2014) et *Microcystis sp*. (Gaëtan et al., 2022). Le processus de carbonatogenèse intracellulaire semble être un processus très répandu chez les cyanobactéries puisque plus de 20 cyanobactéries affiliées à divers genres, familles et ordres ont été observées avec des inclusions d'iACC (Benzerara et al., 2022; Gaëtan et al., 2022). Contrairement aux bactéries *Achromatium sp.* vivant aux interfaces oxique-anoxique des sédiments (Babenzien, 1991; Mansor et al., 2015), les cyanobactéries sont plutôt retrouvées dans la partie oxygénée de la colonne d'eau.

Les MTB formant des carbonates de calcium amorphes ($_{iACC}$MTB) ont été découvertes dans des niches écologiques très similaires à celles d'*Achromatium*. Suite à la première description d'un morphotype de $_{iACC}$MTB (Monteil et al., 2021), plusieurs observations réalisées lors de campagnes d'échantillonnage entre 2019 et 2020 ont suggéré qu'il existait une importante diversité morphologique de $_{iACC}$MTB dans les sédiments du Lac Pavin, Massif Central, France et de Carry-le-Rouet, mer Méditerranée, avec des biominéraux de composition, structure, organisation et taille variés. Cette forme de biominéralisation semble donc être plus répandue dans le monde microbien que ce que l'on pensait et est potentiellement associée à différentes physiologies et métabolismes.

Le rôle de ces carbonates intracellulaires est peu connu bien que plusieurs hypothèses aient été émises sur les processus de formation de ces compartiments intracellulaires (i.e. délimités par une membrane) et de leur potentielle fonction à partir de l'étude des cyanobactéries et *Achromatium spp*. Plusieurs études suggèrent que la biominéralisation des iACC pourrait avoir un rôle de (i) régulation du pH intracellulaire lors de la fixation du C (ii) régulation du Ca^{2+} intra-cytoplasmique, (iii) réserve de C inorganique amorphe favorisant une remobilisation plus rapide du C stocké pour les besoins énergétiques cellulaires, (iv) modification de la flottabilité cellulaire expliquée par la densité élevée des iACC (Benzerara et al., 2014; Blondeau et al., 2018b; Cam et al., 2015; Cosmidis and Benzerara, 2022).

Les déterminants génétiques et environnementaux à l'origine de la formation des carbonates intracellulaires chez ces organismes, tout particulièrement ceux affiliés à l'embranchement des *Pseudomonadota* (anciennement *Proteobacteria*), restent encore inconnus, tout comme leur évolution. Ce travail de thèse a donc visé à caractériser la diversité des MTB formant des carbonates dans le lac Pavin, où elles sont abondantes dans les sédiments et la colonne d'eau afin d'étudier à la fois leurs biominéraux, leur biologie à travers leur génome notamment, leur niche écologique et d'en comprendre quelques éléments sur l'histoire de leur diversification.

Ce travail de thèse a été guidé par les questionnements suivants :

#1. Quelle est la diversité génotypique et phénotypique des iACCMTB dans les zones de transition oxique-anoxique (OATZ) des sédiments, notamment ceux du lac Pavin ? Est-ce qu'il existe des morphotypes / groupes taxonomiques dominants ?

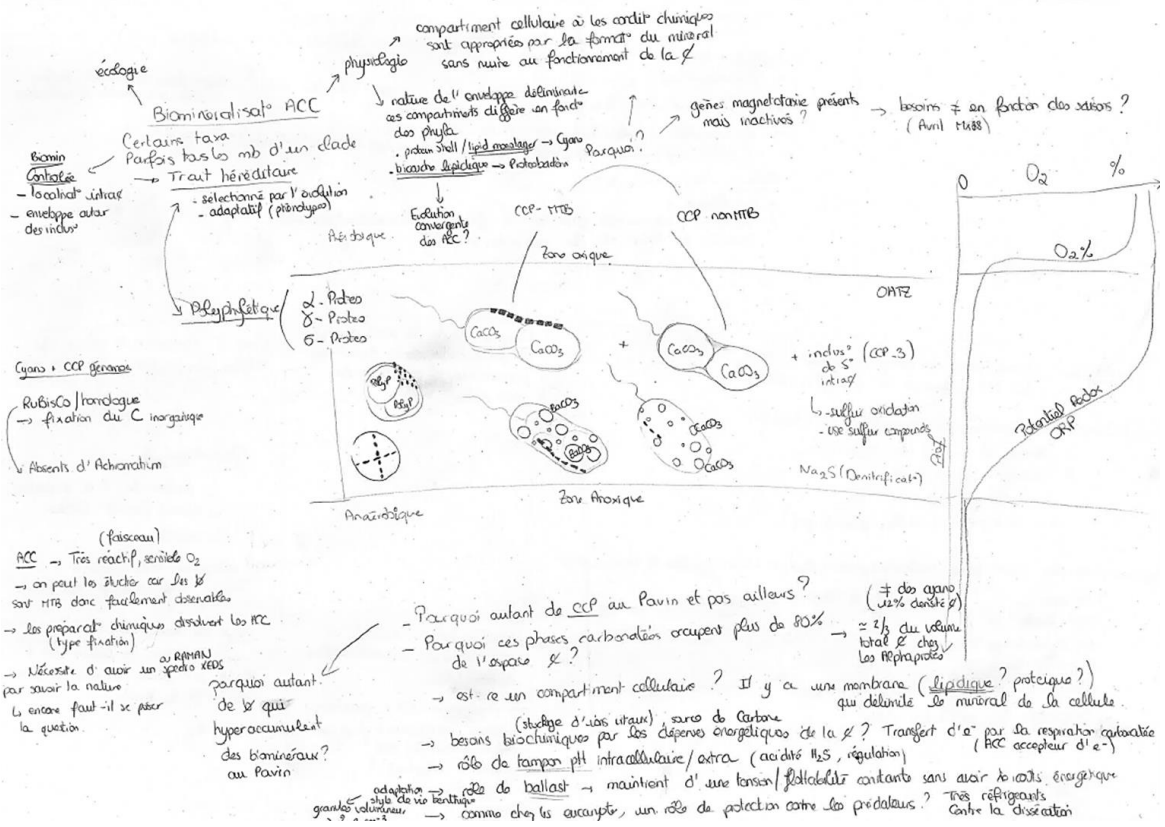
#2. Quels traits biologiques et minéralogiques sont partagés entre les différentes populations de iACCMTB ? Est-ce que toutes les iACCMTB forment des minéraux avec la même composition chimique et structure ?

#3. Quel type de réservoir les populations de iACCMTB représentent-elles dans l'OATZ ? Sont-elles ubiquistes et existent-ils des conditions physicochimiques particulières à leur présence ?

#4. Sous quelle forme était le carbone inorganique initialement utilisé pour la formation des carbonates ? Alternativement, est-ce qu'il existe une ou plusieurs voies métaboliques associées avec l'incorporation de cette forme de carbone ? Quels métabolismes peuvent être utilisés par ces populations ?

#5. Est-ce que la formation des iACC est un trait partagé par d'autres bactéries proches génétiquement des groupes identifiés ? Si oui, peuvent-ils nous aider à comprendre l'origine moléculaire et environnementale de cette formation ?

Durant la thèse, j'ai essayé de connecter toutes ces questions entre elles comme le témoignent certains schémas de mon cahier de laboratoire (**Figure 1**). J'ai apporté des éléments de réponse à chacune de ces questions en menant des échantillonnages au lac Pavin principalement et en y étudiant les populations de iACCMTB par une combinaison d'approches en écologie microbienne, minéralogie, génomique, de tri de cellule unique au niveau de la communauté et de l'environnement naturel au laboratoire. Les résultats de cette thèse ont permis de révéler et mesurer la diversité de ce groupe de microorganismes et de leurs biominéraux, de mieux comprendre le rôle de la biominéralisation des carbonates dans la biologie de ces bactéries dans la zone anoxique des sédiments des environnements aquatiques et d'élucider l'histoire évolutive des iACCMTB.



<u>Figure 1</u> : Photographie d'une partie des notes de mon cahier de laboratoire schématisant la diversité des iACCMTB du lac Pavin et les questions gravitant autour de celle-ci.

Préambule

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique mettant en revue les différents modes de biominéralisation microbienne ainsi que la diversité de minéraux synthétisés par les bactéries. Par la suite, des exemples de modèles de biominéralisation intracellulaire et génétiquement contrôlée, tels que les MTB et les cyanobactéries, seront décrits. La formation de phases carbonatées intracellulaires par les bactéries représentant le cœur du sujet de ma thèse, sa présentation constituera la dernière partie de cette synthèse. Ainsi, les mécanismes moléculaires associés à la biominéralisation de carbonates, les potentielles sources moléculaires de carbone à l'origine de leur formation et les rôles putatifs de ces inclusions chez les bactéries seront présentés.

La seconde partie de ce document est dédiée à la présentation du site d'étude principal (i.e. le lac Pavin), mettant en avant ses caractéristiques géochimiques ainsi que la diversité métabolique des communautés microbiennes.

Enfin, une description complète des stratégies d'échantillonnage et des méthodologies générales utilisées pour l'étude des microorganismes et de leurs biominéraux fait suite.

Les résultats des études menées dans cette thèse sont ensuite présentés sous la forme de quatre chapitres :

Le Chapitre I et II présente l'étude de la diversité phénotypique et génotypique des $_{iAXC}$MTB au niveau des zones de transition oxique-anoxique (OATZ) des sédiments et de la colonne d'eau du Lac Pavin et de différents environnements par une approche de tri de cellule unique : *single cell sorting*.

La première étude portant sur les *Pseudomonadota* et la formation de carbonate de calcium représente l'essentiel de mon travail durant la thèse. C'est donc l'étude la plus développée dans ce rapport. Une description complète des morphologies et ultrastructures cellulaires (e.g. nombre, forme et taille des magnétosomes, des granules d'iACC et des cellules, analyses de composition minéralogique) des populations dominantes a été réalisée. Une classification de ces MTB a été faite selon un ensemble de caractères morphologiques mesurables, puis associées à un groupe taxonomique sur la base des séquences d'ADNr 16S et des génomes. Les bases génomiques et fonctionnelles de la formation des biominéraux ont été étudiées et les voies métaboliques putatives ont été reconstruites. En effet, de nombreux questionnements persistent sur l'origine moléculaire du carbone utilisé et incorporé pour la formation des phases carbonatées intracellulaires. *Sous quelle forme était le carbone inorganique initialement utilisé pour la formation des carbonates* ? *Alternativement, est ce qu'il existe une ou plusieurs voies métaboliques associées avec l'incorporation de cette forme de carbone* ? Grâce aux données génomiques et aux prédictions métaboliques, plusieurs scénarios sont proposés sur

l'histoire évolutive des différentes fonctions de biominéralisation et de leur(s) rôle(s) écologique(s).

La seconde étude fait miroir à la première en terme d'approches et de questions. Elle s'intéresse à la découverte de *Thermodesulfobacterota* formant des inclusions de carbonate de baryum, et apporte les premières caractérisations de ces populations du sédiment du lac Pavin.

Le Chapitre III est consacré à l'étude de la niche biogéochimique occupée par les populations de $_{iAXC}$MTB. Des analyses géochimiques en parallèle d'analyses microbiologiques ont été réalisées par l'IPGP et l'IMPMC de Paris lors de missions de terrain afin d'identifier les conditions chimiques propices à la présence/absence des $_{iAXC}$MTB dans le lac Pavin. Une exploration d'autres cours d'eau et de lacs a également été menée pour étudier l'ubiquité de telles MTB.

Le Chapitre IV est consacré à la recherche d'inclusions de carbonate de calcium chez des souches cultivées d'*Azospirillaceae* afin de trouver un système biologique que l'on puisse étudier en conditions contrôlées pour comprendre la dynamique de formation des biominéraux et leur rôle adaptatif en attendant d'isoler une $_{iACC}$MTB en culture. Quelques milieux de cultures ont été testés sur une sélection de souches sélectionnées grâce au placement phylogénétique des espèces de $_{iACC}$MTB dominantes et une analyse bibliographique des taxa frères.

Enfin, la dernière partie de ce manuscrit est consacrée à une discussion générale, aux principales conclusions et aux perspectives de l'ensemble de ces travaux de recherche.

Synthèse bibliographique

1. Introduction au concept de la biominéralisation microbienne

1.1. Généralités et définitions

Les métaux, qu'ils soient alcalino-terreux ou de transitions, sont des composés impliqués dans presque tous les processus biologiques et sont donc essentiels à la vie. Les microorganismes peuvent avoir un impact important sur leur cycle biogéochimique en les complexant avec d'autres molécules ou en transformant leur état redox. Ils peuvent également les immobiliser sous plusieurs formes dont des formes inorganiques. Un des processus permettant leur immobilisation est la biominéralisation se caractérisant par leur précipitation associée à d'autres éléments comme le soufre, l'oxygène ou le carbone.

La précipitation d'un minéral est thermodynamiquement favorable si l'environnement est sursaturé par rapport à la phase minérale. Cette sursaturation est parfois induite par l'activité cellulaire. Par ailleurs, dans des conditions sursaturées, des composants organiques membranaires ou extracellulaires agissent comme des sites de nucléation et peuvent alors catalyser la précipitation du minéral (Cosmidis and Benzerara, 2022; Park and Faivre, 2021). L'index de saturation et la présence de sites de nucléation sont donc les deux facteurs chimiques principaux contribuant à la précipitation minérale.

De nombreux organismes vivants, dont les eucaryotes et les procaryotes (i.e. bactéries et archées) ont acquis des capacités à former des minéraux (Gadd, 2010; Görgen et al., 2020). Ce phénomène biologique est à l'origine de la formation d'une grande diversité de minéraux, en termes de morphologie, structure, composition et organisation. Certains d'entre eux sont produits de manière active tandis que d'autres sont induits passivement, traduisant différents modes de biominéralisation. De manière plus générale, le processus de biominéralisation est classé en plusieurs catégories suivant différents critères notamment selon (1) la composition du cristal et sa structure cristalline, (2) l'importance du degré de contrôle biologique par rapport à celui de la chimie, et (3), la localisation de la minéralisation qui peut être intracellulaire, périplasmique ou à l'extérieur de la membrane externe.

Il existe trois principaux processus de biominéralisation dont les mécanismes de formation/précipitation du minéral sont bien distincts : la minéralisation induite biologiquement, la minéralisation influencée biologiquement ou la minéralisation contrôlée génétiquement. L'ensemble de ces différents processus est détaillé dans les sections suivantes (**Figure 2**).

1.1.1. Biominéralisation influencée ou induite

Il est à noter que les définitions des processus de biominéralisation induite et influencée ont évolué à travers le temps. En effet, certains auteurs préfèrent utiliser le terme d'*organominéralisation* (Diaz et al., 2017; Dupraz et al., 2009; Gallagher et al., 2012) pour englober au sens large le processus de biominéralisation influencée et induite. De plus, définir le type de biominéralisation peut parfois s'avérer complexe car les deux processus peuvent se produire simultanément (Dupraz et al., 2009; Iniesto et al., 2021), ce qui pourrait éventuellement expliquer qu'on les associe fréquemment.

Ainsi, la biominéralisation influencée ou induite sont deux processus très souvent regroupés. Ces deux modes de minéralisation se produisent de manière extracellulaire, généralement au niveau de la région extra-cytoplasmique au sein de la paroi cellulaire et parfois même à distance des cellules (Cosmidis and Benzerara, 2022). Néanmoins, leurs mécanismes sont assez différents et ne sollicitent pas les mêmes déclencheurs. Le terme « précipitation minérale » est d'ailleurs très souvent utilisé dans le cas d'un processus de minéralisation extracellulaire.

La **biominéralisation influencée** est un mécanisme dit « passif ». C'est un processus qui ne requiert pas de cellules métaboliquement actives ou de cellules vivantes (Cosmidis and Benzerara, 2022). Ce sont les parois cellulaires composées de peptidoglycane ou des structures organiques extracellulaires (EPS) qui vont agir comme des surfaces de nucléation et catalyser la précipitation du minéral dans des solutions sursaturées (**Figure 2A**). D'un point de vue thermodynamique, les surfaces cellulaires vont diminuer la barrière d'énergie libre (delta G) de surface et provoquer la précipitation du minéral.

La **biominéralisation induite** est un mécanisme dit « indirect » car la précipitation du ou des minéraux est induite indirectement suite à des changements chimiques locaux au sein de la cellule. Ces derniers peuvent être provoqués principalement par des évènements tels que les réactions redox, les transformations d'oxydoréduction, des changements de pH, et l'activité métabolique des cellules (**Figure 2B**). Bien que l'organisme et son métabolisme provoquent activement la précipitation, il n'existe pas de contrôle organique sur la nucléation et la croissance du minéral. En revanche, l'ensemble de ces changements va augmenter la saturation de la solution pouvant conduire à une sursaturation (**Figure 2B**). Ce processus de biominéralisation nécessite donc des cellules ou enzymes actives métaboliquement.

Ces mécanismes sont parfois considérés comme « *accidentels* » ou « *une conséquence involontaire et incontrôlée des activités métaboliques* » par la cellule et ne remplissent pas spécifiquement une fonction biologique, autre qu'un rôle de « *déchet* » (Frankel and Bazylinski, 2003). A ce jour, il n'existe pas de données génétiques (e.g. gène ou protéine) pouvant être corrélées à ces deux voies de biominéralisation et les expliquer. C'est

pourquoi, le terme de **précipitation minérale semble plus adapté pour les mécanismes moléculaires induits ou influencés, au lieu de biominéralisation**. Bien qu'il n'existe pas de contrôle génétique par le microorganisme, certains processus semblent toutefois interconnectés biologiquement et résulter de mécanismes adaptatifs et évolutifs. Par exemple, des biominéraux extracellulaires de $CaCO_3$ (calcite) ont été identifiés comme des composants de la matrice extracellulaire des biofilms microbiens ; ces derniers semblent donc procurer d'importants avantages reproductifs (i.e. fitness) aux bactéries (Keren-Paz et al., 2018; Keren-Paz and Kolodkin-Gal, 2020). En effet, les minéraux $CaCO_3$ extracellulaires vont former une structure renforçant le biofilm en protégeant les bactéries de menaces extérieures. Ces auteurs soulignent donc l'importance de reconsidérer cette voie de minéralisation (i.e. calcification extracellulaire), comme un processus adaptatif et évolutif (et non « accidentel ») compte tenu de l'importance du minéral dans la structure de la matrice des biofilms.

Il existe également des cas particuliers où les processus de biominéralisation influencée et induite peuvent se dérouler de manière simultanée. Par exemple, la biominéralisation de calcite par les tapis microbiens composés de communautés photosynthétiques peut se produire à la suite de deux évènements. Tout d'abord les activités métaboliques associées à la photosynthèse peuvent provoquer une augmentation de l'alcalinité et induire une saturation de la solution par rapport au $CaCO_3$. Ensuite la thermodynamique de la matrice EPS et des parois cellulaires peuvent agir comme des surfaces de nucléation minérale (Cosmidis and Benzerara, 2022; Dupraz et al., 2009; Iniesto et al., 2021).

1.1.2. Biominéralisation contrôlée

La formation de minéral contrôlée biologiquement est définie par plusieurs scientifiques comme le processus de *minéralisation médiée par une matrice organique* (Lowenstam, 1981; Mann, 2003). Dans cette forme de minéralisation, l'organisme exerce un contrôle cristallochimique strict sur la nucléation, la croissance et la localisation finale des biominéraux formés (Bazylinski and Frankel, 2003; Cosmidis and Benzerara, 2022). Dans la plupart des cas, ces particules minérales sont directement synthétisées à l'intérieur ou sur la cellule, et seulement dans certaines conditions. Elles se caractérisent par des phases minérales solides amorphes ou cristallines. En raison de ces caractéristiques, ces processus strictement contrôlés sont susceptibles d'être soumis à des conditions biochimiques et génétiques qui leurs sont bien spécifiques. En effet, la minéralisation biologiquement contrôlée implique un mécanisme actif spécifique qui va permettre de concentrer et séquestrer l'espèce métallique dans un compartiment intracellulaire (**Figure 2C**). **L'observation systématique d'une membrane autour du minéral et la détection de gènes codant pour des protéines transmembranaires ont permis d'élucider un degré de contrôle génétique** (Görgen et al., 2020). Les transporteurs membranaires semblent donc essentiels à la nucléation du minéral (**Figure 2C**). La

biominéralisation contrôlée est connue pour se dérouler le plus souvent de manière **intracellulaire**. Toutefois ce processus peut également être extracellulaire et/ou commencer de manière intracellulaire en se terminant à une localisation extracellulaire. Plus rarement, la biominéralisation contrôlée peut également se dérouler au niveau du périplasme. En effet, la formation périplasmique de nanoparticules de sulfure de cuivre a été observée chez une bactérie magnétotactique *Desulfamplus magnetovallimortis* souche BW-1 (Park et al., 2022). L'identification de protéines périplasmiques et la délimitation du minéral par une matrice organique soutiennent qu'il s'agit d'un cas de biominéralisation intracellulaire impliquant un contrôle biologique.

De nombreux **eucaryotes microbiens** sont capables de biominéralisation contrôlée et possèdent des fonctions biologiques bien spécifiques (e.g. structure, protection, et/ou acquisition de nourriture). Ces phases minérales ont ainsi des propriétés chimiques et structurelles qui sont strictement contrôlées génétiquement, tout comme leur localisation cellulaire (vésicule ou matrice organique) (Cosmidis and Benzerara, 2022). Le contrôle génétique strict sur la formation et les propriétés des biominéraux est un phénomène plus rarement observé chez les **procaryotes**. En raison du manque de données génétiques, la diversité des processus de biominéralisation contrôlée par les procaryotes reste peu explorée, compte tenu des difficultés à les isoler et/ou d'obtenir leur génome. Dans le monde microbien, l'exemple de biominéralisation contrôlée le plus caractérisé est la formation de magnétosomes par les **bactéries magnétotactiques** (MTB) (Faivre and Schüler, 2008). La synthèse de nanocristaux magnétiques a une fonction spécifique chez les MTB. De ce fait, ce groupe de bactéries représente un excellent modèle de biominéralisation contrôlée (Voir section 2.).

A noter que la classification de la biominéralisation n'est pas toujours facile et parfois ambiguë; certains exemples se situeraient à mi-chemin entre la biominéralisation induite et contrôlée (Bazylinski and Frankel, 2003). Selon les auteurs, quelques cas de biominéralisations intracellulaires (i.e. sulfure de cadmium ou de sulfure de mercure) seraient difficiles à classer en une seule catégorie. Dans ces cas précis, il est possible que certaines données soient manquantes pour déterminer avec exactitude le degré de contrôle biologique ou chimique. Ainsi, au sein d'une même bactérie, peuvent se dérouler plusieurs voies de biominéralisation interdépendantes/interconnectées (i.e. induite, influencée ou contrôlée). Un premier processus impliqué dans la formation d'un minéral favoriserait le développement d'une matrice organique extracellulaire. Par exemple, chez *Bacillus subtilis*, ce n'est que lorsque la production extracellulaire de calcite se produit que les cellules peuvent activer la formation du biofilm et réguler génétiquement la production d'une matrice extracellulaire (Keren-Paz et al., 2022). D'autres revues témoignent de cette complexité de classification (Cosmidis and Benzerara, 2022; Görgen et al., 2020; Park and Faivre, 2021).

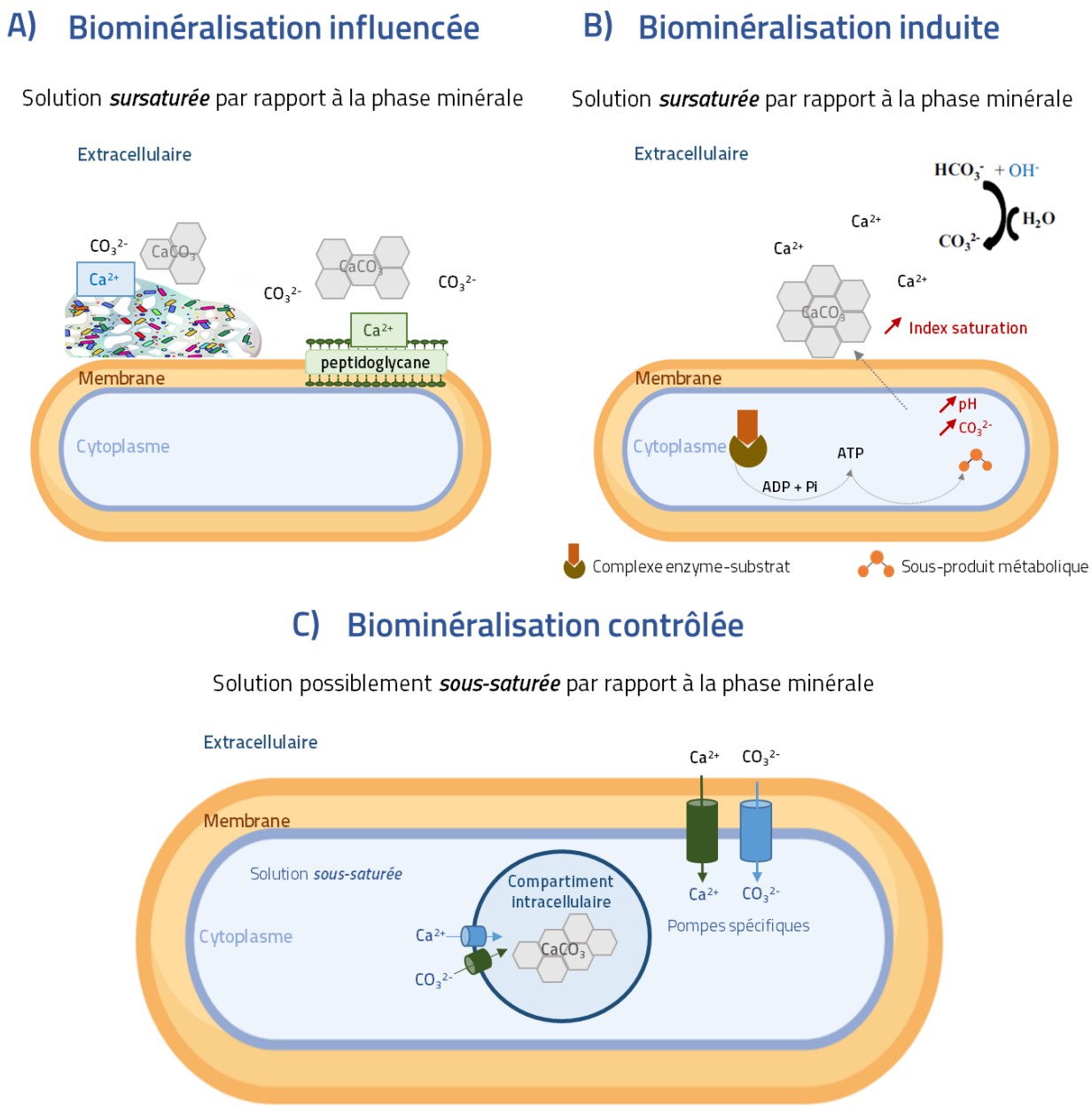


Figure 2 : Représentation schématique illustrant les trois voies de biominéralisation. Schéma basé sur l'exemple de la biominéralisation du $CaCO_3$) classées selon le degré de contrôle biologique. A) Biominéralisation influencée, B) induite, et C) contrôlée. Figure inspirée de Görgen *et al.* (2020).

1.2. Diversité des minéraux amorphes et cristallins

Il existe plusieurs processus géochimiques pouvant conduire à des caractéristiques structurelles différentes de minéraux. **Un minéral peut donc posséder la même composition chimique et posséder différentes organisations atomiques et structurelles**. Par exemple, il existe six minéraux composés de carbonates de calcium ($CaCO_3$) avec différentes structures : calcite, aragonite, vatérite, carbonate de calcium monohydraté, carbonate de calcium hexahydraté, et carbonate de calcium amorphe (Berenjian and Seifan, 2022). Ces différentes structures sont appelées « polymorphes ». Pareillement, il existe deux principaux états de la matière solide : amorphe et cristallin.

L'état amorphe se caractérise par une structure désordonnée, sans motif régulier, tandis que l'état cristallin présente une structure atomique bien organisée et répétitive (Hu et al., 2017). En effet, dans un matériau amorphe, les atomes ne sont pas disposés de manière ordonnée à longue distance, lui conférant des propriétés souvent très différentes de celles des matériaux cristallins. En revanche, les matériaux cristallins ont une disposition régulière des atomes ou des molécules, formant une structure en réseau.

De manière générale, les propriétés structurales et géométriques de matériaux peuvent être comparées au moyen de la microscopie électronique et de la tomographie (Albers et al., 2015). Des subtilités existent, notamment l'aspect structural des surfaces externes du minéral qui peut paraitre parfois très similaire entre un matériau amorphe et cristallin. Toutefois, c'est en observant les détails au sein de la structure interne qu'il est possible de trancher sur l'organisation atomique du minéral et d'élucider sa structure : cristalline, quasi-cristalline ou amorphe (**Figure 3**). Les cristaux sont donc des minéraux possédant une structure atomique ordonnée et sont bien différenciés des minéraux amorphes dont les atomes sont agencés de manière irrégulière. Néanmoins, certains matériaux peuvent présenter une combinaison des deux états, amorphe et cristallin : quasi-cristallin (Büchner and Heyde, 2017) ou quasi-amorphe.

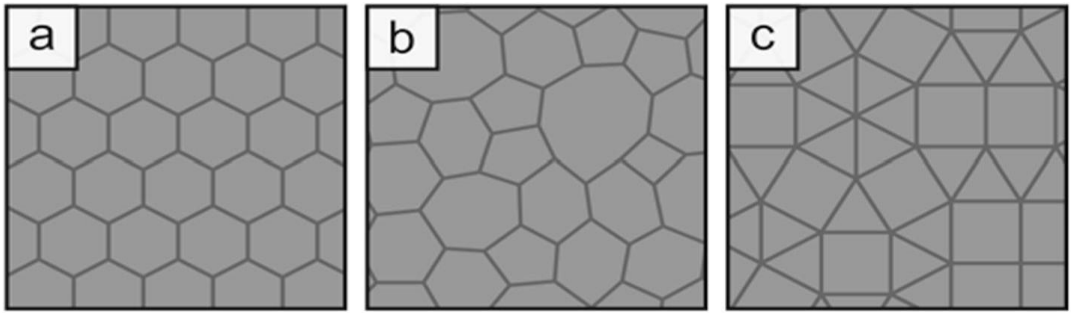


Figure 3 : Schéma d'un cristal bidimensionnel, d'un réseau amorphe et d'un quasi-cristal. a) Réseau cristallin en nid d'abeilles ordonné, présentant un ordre et une périodicité à longue portée avec un nombre de coordination constant. b) Réseau amorphe sans ordre ni périodicité à longue distance, mais un nombre de coordination constant. c) Réseau quasi-cristallin, présentant un ordre à longue portée, mais pas de périodicité et des nombres de coordination variables (Büchner and Heyde, 2017).

1.3. Diversité des biominéraux au sein du vivant

La minéralisation médiée par les organismes vivants est un phénomène très répandu et observé dans les trois règnes du vivant : *Eukaryota*, *Bacteria* et *Archaea* (Gadd, 2010; Kenward et al., 2009; Roberts et al., 2013). Bien qu'il existe une diversité de composition chimique et structurelle, quelques espèces minérales sont majoritairement voire systématiquement observées chez les organismes vivants. En effet les biominéraux les plus répandus sont majoritairement composés de phosphate, de carbonate et de silice (**Figure 4**) (Knoll, 2003). De manière évidente, la biominéralisation est un processus ubiquitaire mais semble conférer aux eucaryotes des fonctions totalement différentes par rapport aux procaryotes. Les sections suivantes présentent cette diversité d'organismes

et de biominéraux par domaine du vivant, en développant particulièrement les cas chez les microorganismes qui nous intéressent ici.

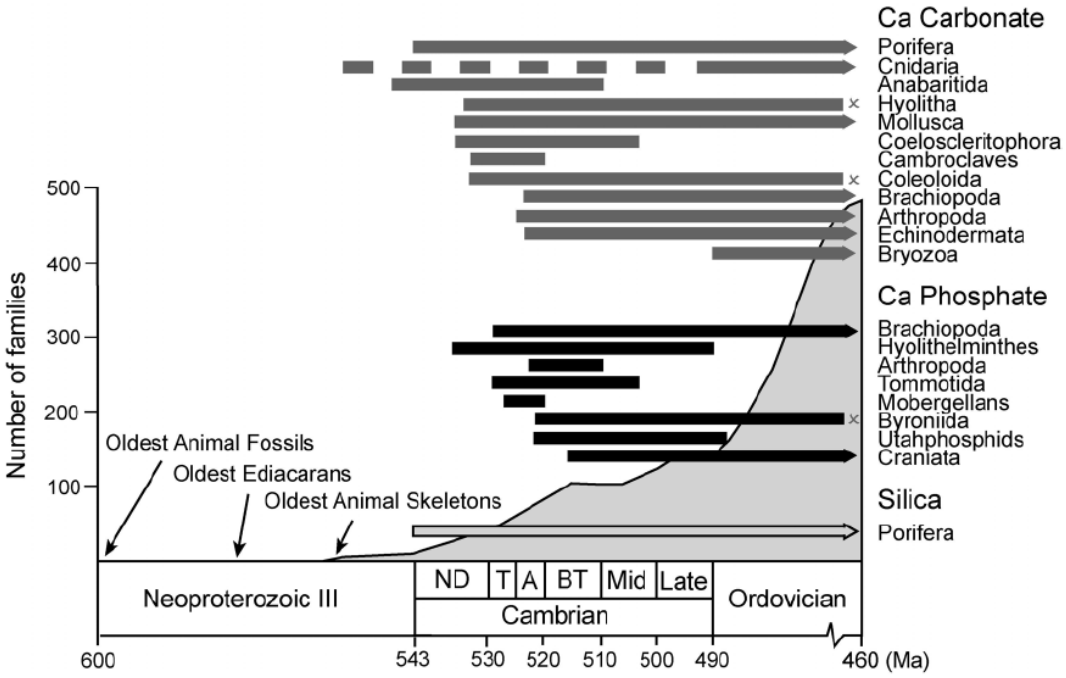


Figure 4 : Evolution de la biominéralisation du squelette chez les métazoaires, montrant la diversité, la minéralogie de squelette et la répartition stratigraphique des animaux du Cambro-Ordovicien. Knoll (2003).

1.3.1. La biominéralisation par les macro-organismes eucaryotes

La biominéralisation est répandue chez les « organismes supérieurs », i.e. les eucaryotes pluricellulaires dont les cellules spécialisées s'organisent en tissu dans l'organe où elles opèrent. Elle confère un rôle dans la structure de l'organisme, la défense, la perception sensorielle ou encore la prise de nourriture (Cosmidis and Benzerara, 2022; Knoll, 2003). Familièrement, tous les grands groupes sont capables de former des biominéraux : les bilatériens dans lesquels on retrouve les vertébrés, les mollusques ou encore les arthropodes ; les plantes vasculaires, les cnidaires (e.g. coraux), ou encore les éponges. De manière intéressante, ces biominéraux sont **essentiellement à base de calcium et de carbonate** et auraient émergés depuis le Cambrien, période qui s'étend de −543 à −490 millions d'années, et qui succède au Néoprotérozoïque et précède l'Ordovicien (**Figure 4**). Dans une moindre mesure et par ordre décroissant, on trouvera des phosphates, oxalates, sulfates, et des silices. Parmi les exemples marquants et bien connus, on peut citer les structures minéralisées suivantes : exosquelettes, coquilles, spicules, endosquelette (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Diversité des structures biominéralisées et leurs fonctions au sein des organismes macro- et micro-eucaryotes. Tableau inspiré de Bordenave et al. 2013. Les références bibliographiques sont indiquées à la fin du tableau.

Minéral	Polymorphe	Organismes	Structure/Fonction
Carbonate de calcium	Calcite	Coccolithophoridés, foraminifères, mollusques, crustacés, échinodermes, mammifères	Paroi cellulaire, plaques calcaires, coquilles, exosquelette, organe visuel, perception de gravité
	Aragonite	Cnidaires, mollusques, téléostéens	Exosquelette, otolithes (perception de gravité, équilibre)
	Vatérite	Ascidies, mollusques	Spicules
	Amorphe (ACC)	Plantes, crustacés, échinodermes, mollusques, vertébrés	Squelette, réserves de calcium
Phosphate de calcium	Hydroxyapatite	Vertébrés	Endosquelette, dents, réserves de calcium
	Phosphate d'octacalcium	Vertébrés	Précurseurs osseux (apatite biologique)
	Amorphe	Mollusques, vertébrés	Réserves de calcium, précurseurs osseux
Oxalate de calcium		Plantes supérieures	Réserves de calcium
Sulfate	Sulfate dihydraté de calcium	Cnidaires (e.g Méduses)	Perception de gravité
	Sulfate de strontium (Célestite)	Acanthaires (e.g Protiste, Radiolaire)	Exosquelette
Silice	Amorphe (Opale)	Diatomées, Eponges (Porifera)	Exosquelette, spicules
Références bibliographiques	Tableau inspiré de Stéphanie Bordenave *et al.* 2013 Brownlee C, *et al* . 2021 (Coccolithophores); Oudot, 2021 (Mollusques); Luquet G. 2012 (Crustacés); Gilbert PU, Wilt FH. 2011 (Echinodermes); G Falini. 2015 (Cnidaires, Coraux); Franceschi V R and Nakata P A. 2005 (Plantes, Oxalate de calcium); Fujimaki R et al. 2022 (Radiolaire); Becker A *et al.* 2005 (Cnidaires, Méduses); Müller Werner E G *et al* . 2003 (Eponges); Suzuki O. *et al.* 2008 (Vertébrés, phosphate d'octacalcium)		

1.3.2. La biominéralisation par les micro-organismes eucaryotes

Les micro-organismes eucaryotes unicellulaires (e.g. protozoaires, micro-algues) sont tout autant en capacité de biominéraliser des structures minérales, de composition chimique et de structure variée (**Tableau 1**). De manière similaire aux eucaryotes pluricellulaires, leurs phases minérales formées sont majoritairement composées de polymorphes de carbonate de calcium (e.g. micro-algues, foraminifères) et dans une moindre mesure de sulfate (e.g. acanthaires) et de silice (e.g. diatomées). De plus, leurs formations biominérales semblent leur conférer les mêmes fonctions de protection (e.g exosquelette, coquille et spicule). Toutefois, la majorité d'entre eux forment des minéraux **extracellulaires**, mais certains ont été observés avec des structures biominéralisées **intracellulaires**.

Par exemple, certaines micro-algues marines unicellulaires telles que les *Coccosphaerales* sont connues pour biominéraliser des structures cristallines **extracellulaires** en forme de disque tout autour de leur cellule, composées de calcite ($CaCO_3$) appelées coccolithes (Yin et al., 2018). Cet exemple de biominéralisation est assez singulier. Les coccolithophores vont former ces structures calcifiées de manière intracellulaire, dans un compartiment dédié, et les secrètent à la surface de la cellule. La formation des coccolithes nécessite des approvisionnements en grandes quantités de calcium depuis l'eau de mer jusqu'au compartiment de calcification. Ces mécanismes de transfert n'ont pas encore été déterminés**.** Néanmoins, un compartiment intracellulaire a été décrit contenant une phase de phosphate de calcium pouvant intervenir dans l'approvisionnement du Ca pour la calcification des coccolithes (Gal et al., 2017). A ce jour, une grande diversité de morphologies et de structures a été mise à jour chez les coccolithophores et de nombreuses espèces ont été décrites (**Figure 5**).

De nombreux microorganismes eucaryotes sont également capables de biominéraliser de la silice (i.e. silicification) **extracellulaire**. L'exemple des diatomées est le plus connu. Toutes les diatomées sont pourvues d'un exosquelette poreux entièrement fait de silice, connu sous le nom de « *silicified cell wall* ». En effet, ces structures minéralisées siliceuses vont aider dans le maintien et la structure de leur paroi cellulaire (frustule). De manière similaire aux coccolithes, ces éléments permettant la fabrication de la paroi cellulaire sont initialement formés intracellulairement (dans des vésicules de dépôt de silice liées à la membrane) et exocytés après achèvement (de Haan et al., 2023; Sumper and Lehmann, 2006). La biominéralisation de silice est également retrouvée chez de nombreux protozoaires marins. Néanmoins, la silicification est limitée à la précipitation **extracellulaire**. Ainsi, les écailles de silice et les exosquelettes sont très abondants chez certains d'entre eux, notamment chez les radiolaires, chez certaines rhizaires *Cercozoa*, et chez les straménopiles *Heterokonta* (i.e. frustules) (Knoll, 2003).

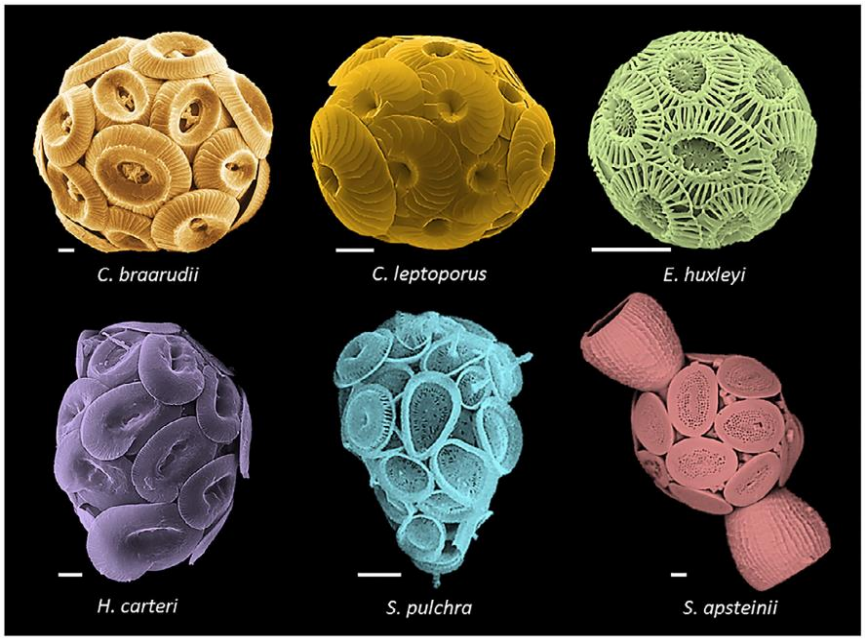


Figure 5 : Images colorisées de microscopie électronique montrant la diversité morphologique de coccolithophores. En haut (de gauche à droite) : *Coccolithus braarudii, Calcidiscus leptoporus, Emiliania huxleyi*. En bas : *Helicosphaera carteri, Syracosphaera pulchra, Scyphosphaera apstenii*. Barres d'échelle, 2 µm. (Brownlee *et al.*, 2021)

Des structures minéralisées **intracellulaires** très diverses ont également été observées parmi les micro-organismes eucaryotes unicellulaires. En effet plusieurs espèces du genre *Tetraselmis spp.* d'eau douce et marine sont capables de biominéraliser des granules intracellulaires amorphes (« *ACC micropearls* ») composés de carbonates riches en calcium, strontium et baryum (e.g métaux alcalino-terreux) (**Figure 6**) (Martignier et al., 2018, 2017). Les microperles d'ACC semblent être un trait phénotypique et/ou fonctionnel partagé par quasiment toutes les espèces appartenant au genre *Tetraselmis*, suggérant possiblement une seule origine et un caractère monophylétique. De manière plus surprenante, ce type de minéral amorphe et enrichi en métaux alcalino-terreux (AEM) est formé également chez d'autres eucaryotes microbiens et affiliés à d'autres groupes taxonomiques. Certains organismes biflagellés (non identifiés) ont été observés avec des structures minéralisées quasi-similaires et intracellulaires, enrichies en baryum (Martignier et al., 2017). Des populations picoplanctoniques ont également été observées avec des corps intracellulaires (« microsphères ») composés de carbonates amorphes enrichis en métaux alcalino-terreux (*AEM carbonates*) (Jaquet et al., 2013). Bien qu'elle soit peu décrite dans la littérature, la capacité de former des microperles intracellulaires (i.e. ACC ou AEM) semble être plus répandue que ce que l'on pensait, et partagée par divers microorganismes.

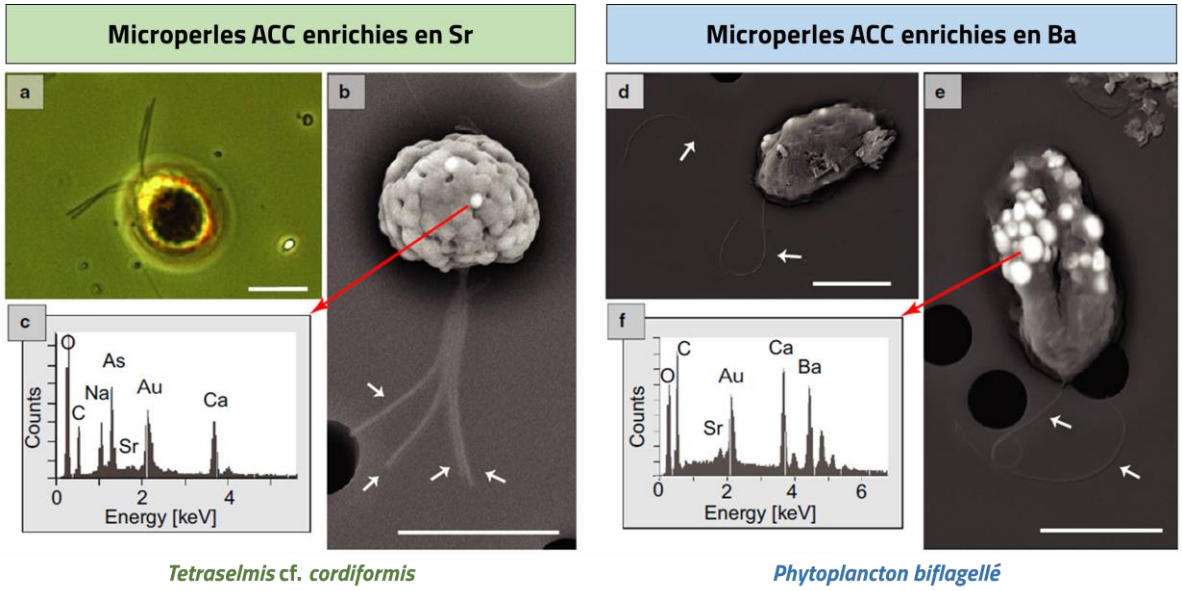


Figure 6 : Microperles intracellulaires d'ACC enrichies en Strontium (Sr) chez *Tetraselmis* cf. *cordiformis* et d'ACC et enrichies en Baryum (Ba) chez une algue (phytoplancton) biflagellée. (a) Image de microscopie optique de Tetraselmis cf. *cordiformis.* (b) Image de MEB des microperles intracellulaires de Sr (gris clair). (c) Spectre XEDS des microperles de Sr : en raison de la petite taille de la microperle, le résultat comprend également de la matière organique (c) et un fixateur (Na, As) en plus du revêtement (Au). (d) et (e) Images de MEB d'un phytoplancton biflagellé avec des microperles intracellulaires de Ba (en blanc). (f) Spectre XEDS des microperles de Ba. Les flèches indiquent les flagelles. Barres d'échelle blanche : 10 µm. Martignier *et al.* (2017)

La présence de nano-structures **intracellulaires** a été mise en évidence chez des protistes flagellés. En effet, des cristaux de magnétite (Fe_3O_4) intracellulaires et organisés en chaine ont été observés chez une algue affiliée au genre *Anisonema* et à la famille des *Euglenophyceae* (Torres de Araujo et al., 1986). Ces minéraux seraient impliqués dans la magnétoréception comme chez les bactéries magnétotactiques (MTB). Bien que cette algue soit sensible aux lignes du champ magnétique terrestre (i.e. magnétoréception), l'origine de ses cristaux reste difficile à déterminer. Hormis la morphologie des magnétites (i.e. balle fusiforme) ressemblant à celle des MTB affiliées à l'embranchement des *Thermodesulfobacteriota* (anciennement rassemblés dans la classe des *Deltaproteobacteria*), l'absence de données d'ultrastructures et de typage moléculaire ne permettent pas d'affirmer si la minéralisation des cristaux provient du protiste ou d'autres organismes qu'il aurait auparavant ingérés (protiste brouteur). De plus, la découverte des magnétosymbioses chez les protistes soutient une origine bactérienne à ces biominéraux et non eucaryote (Monteil et al., 2019). La magnétoréception serait rendue possible par un consortium composé d'une MTB non mobile et capable de produire des magnétosomes de magnétite et d'un protiste flagellé non magnétotactique (**Figure 7**). L' étude d'un autre protiste magnétotactique, soutient l'hypothèse que les cristaux de magnétite pourraient être biominéralisés par le protiste lui-même (Leão et al., 2019). Bien qu'il y ait des différences de morphologie et de taille (e.g. magnétosomes, cellule, flagelle) avec le protiste observé 30 ans auparavant, l'absence de données d'ultrastructure en coupes transversales ne permet pas de valider l'hypothèse d'un protiste magnétotactique biominéralisant, bien qu'il soit magnétoréceptif.

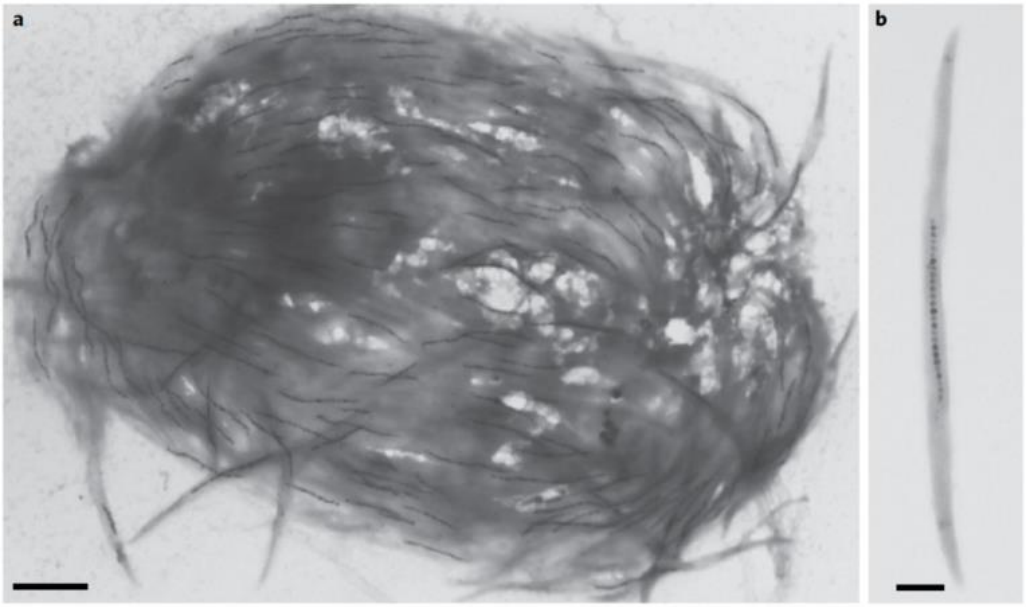


Figure 7 : Magnétosymbiose entre un protiste flagellé et des bactéries magnétotactiques ectosymbiontes. Images en microscopie électronique du protiste magnétique échantillonné en mer Méditerranée. Images de MET montrant l'ultrastructure d'un seul consortium magnétique contenant environ 150 chaînes de magnétosomes (a) et une bactérie ectosymbiotique magnétique détachée de son hôte (b). Barres d'échelles : 2 µm et 0,5 µm pour a et b, respectivement. Monteil *et al.* (2019).

1.3.3. Exemples de biominéralisation par les procaryotes

Les procaryotes regroupent les archées et les bactéries. Seuls quelques cas de biominéralisation par les **archées** ont été recensés dans la littérature. Il semblerait que des consortiums microbiens en anaérobie composés de bactéries dissimilatrices réductrices de fer (DIRB), de fermenteurs et d'archées méthanogènes soient impliquées dans la précipitation de dolomite (i.e. minéral composé de carbonate de calcium et de magnésium) (Kenward et al., 2009). La minéralisation de fer est un processus qui est commun à certaines archées hyperthermophiles, notamment des archées affiliées à l'ordre des *Thermococcales* formant des structures minéralisées cristallines extracellulaires de greigite (Fe_3S_4) sur leurs substances polymériques extracellulaires (EPS) (Gorlas et al., 2018) et les archées acidophiles telles que *Sulfolobus solfataricus* synthétisant une protéine capable d'oxyder le Fe (II) en Fe (III) formant ainsi des oxydes ferriques autour de la protéine (Wiedenheft et al., 2005).

Bien que ces exemples montrent l'implication des archées dans la formation de biominéraux, les **bactéries** sont les principales concernées lorsqu'on parle de biominéralisation par les procaryotes. C'est au 19ème siècle que deux scientifiques ont mis en évidence la minéralisation d'oxydes de fer par *Gallionella ferruginea* (Ehrenberg, 1836) et la minéralisation de carbonates de calcium par *Achromatium oxaliferum* (Schewiakoff W, 1893). A la suite de ces découvertes, une large diversité de biominéraux a été observée et certains d'entre eux ont été identifiés, tout comme les microorganismes qui en sont à l'origine. En effet, ces derniers peuvent biominéraliser de l'argile, de la silice (SiO_2), des oxyhydroxydes de Fe (III), de la magnétite (Fe_3O_4), des sulfures de Fe tels que la greigite

(Fe_3S_4), pyrrhotite (Fe_7S_8), mackinawite (FeS), pyrite (FeS_2 cubique), marcasite (FeS_2 orthorhombique), des sulfures de Ni, Cu, Zn, As, Cd, des phosphates de Fe, du soufre élémentaire, ainsi que des carbonates extracellulaires et intracellulaires (Cosmidis and Benzerara, 2022; Park and Faivre, 2021). Tout comme les organismes eucaryotes, les procaryotes peuvent donc former des biominéraux de composition chimique très variée, et formés de manière **extracellulaire** ou **intracellulaire**.

1.3.3.1. Biominéraux extracellulaires

Les biominéraux extracellulaires sont produits par les bactéries par un mécanisme de minéralisation extracellulaire. Pour rappel, dans ce type de processus, la bactérie produit une matrice organique à l'extérieur ou contournant la cellule, formant le site de nucléation. Grâce à des pompes spécifiques, la bactérie se procure les éléments cationiques à travers la membrane cellulaire vers le site de nucléation destiné. Inversement, les cations peuvent être également concentrés à l'intérieur de la cellule, qui sont ensuite exportés à travers la membrane.

De nombreuses bactéries sont capables de former des biominéraux de fer extracellulairement en partie par leur activité métabolique. Certaines bactéries ferro-oxydantes peuvent oxyder le Fe (II) en Fe (III) via différentes voies métaboliques et synthétiser des structures **extracellulaires** riches en oxydes de Fe (Bochet et al., 2020; Hallberg and Ferris, 2004) (**Figure 8**).

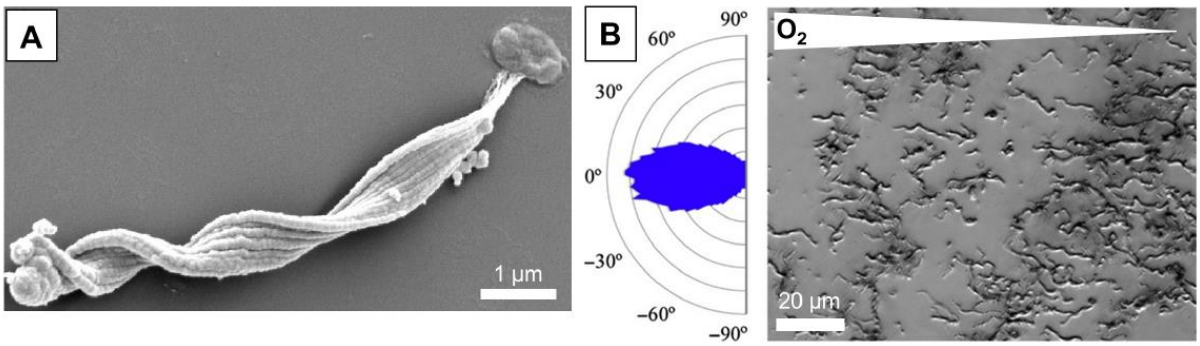


Figure 8 : Structures extracellulaires précipitées par *Mariprofondus ferrooxydans*. (A) Image MEB d'une souche *Mariprofundus ferrooxydans* PV-1 et de sa tige torsadée biominéralisée (Chan *et al.*, 2016). (B) Image de microscopie de *M. ferrooxydans* se développant en présence d'un gradient d'oxygène. Le tracé radial correspondant montre l'orientation directionnelle des tiges dans le gradient d'oxygène (Krepski *et al.*, 2013). Cosmidis et Benzerara (2022).

L'activité sulfato-réductrice des bactéries joue également un rôle clé dans la réduction des sulfates en sulfures et peut favoriser la précipitation des minéraux **extracellulaires** tels que les sulfures de fer comme la pyrite (FeS_2) (Berg et al., 2020) et des phosphates de fer comme la vivianite ($Fe_3(PO_4)_2.8H_2O$) dans certaines conditions (e.g. en présence de métaux) (Berg et al., 2019). En effet, la précipitation de minéraux de pyrite est favorable lorsqu'il y a des conditions réunies simultanées : (i) sulfuration de phosphate de Fe (III) et (ii) présence et contribution d'un consortium de bactéries soufrées et sulfato-réductrices, *Desulfovibrio* et *Sulfurospirillum*, très abondantes dans les environnements

ferrugineux et riches en phosphate (Berg et al., 2020). La précipitation d'hydroxydes de fer peut également avoir lieu grâce à l'activité microbienne réductrice des oxydes de Fe(III) réalisée notamment par des bactéries réductrices du fer par dissimilation (i.e. utilisant le fer comme accepteur terminal d'électrons pour leur respiration). Par exemple, *Shewanella putrefaciens* participe à la minéralisation de ces minéraux issus de la bioréduction de la ferrihydrite ou de la lépidocrocite (Ona-Nguema et al., 2002; Zegeye et al., 2005).

Bien qu'elle soit plus rare, la formation de biominéraux **extracellulaire** est possible par des mécanismes de biominéralisation se situant à l'interface de processus **contrôlé** et **induit**. Même si la minéralisation se produit en raison de site de nucléation et d'une augmentation du pH provoquée par une activité métabolique, le contrôle de la biominéralisation par une bactérie *via* des mécanismes biologiques spécifiques et contrôlés semble possible. Des cyanobactéries affiliées à l'ordre des *Synechococcales* sont capables de biominéraliser des silicates amorphes enrichis en Fe (III) et en Mn (IV) dans des conditions oxiques et alcalines (Benzerara et al., 2023). Les biominéraux extracellulaires formés se regroupent sous forme de petits globules disposés en anneaux autour du septum de division des cellules (**Figure 9**). Ces anneaux sont enveloppés dans une matrice organique composée de polysaccharides et sont associés au plan de division cellulaire. La morphologie spécifique amorphe du minéral, la compartimentation de ces derniers enveloppés par la matrice d'EPS et les conditions environnementales sous-saturées par rapport à la phase minérale, laissent penser que la cellule est capable de concentrer efficacement le Fe et Mn localement.

Dans le cadre de recherche en paléontologie, des scientifiques ont découvert de nombreuses roches laminaires (i.e. structurées en feuillets) massives calcaires appelées stromatolithes (Paul et al., 2011). De manière surprenante, ces structures minérales sont précipitées à l'aide de tapis microbiens photosynthétiques composés principalement de cyanobactéries (Popall et al., 2020; Spadafora et al., 2010). Ainsi, les stromatolithes sont des formations extracellulaires sédimentaires produites par un consortium de cyanobactéries lors de l'activité photosynthétique. Ces roches carbonatées microbiennes sont plus communément appelées microbialites (Couradeau et al., 2012) afin de souligner la contribution importante des microorganismes. Cet exemple de biominéralisation est détaillé dans la section **3.1**.

Tout comme les eucaryotes pluri- et uni-cellulaires, les bactéries ont un rôle important dans le processus de calcification et sont appelés bactéries calcifiantes « *calcifying bacteria* ». Par exemple, des consortiums bactériens composés d'espèces de *Virgibacillus sp*. et *Salinivibrio sp.* contribuent à la formation de $MgCa(CO_3)_2$, considéré comme précurseur de dolimite. Parfois, cette faculté à former des cristaux extracellulaires de carbonate de calcium est utilisée à des fins de construction, conservation et/ou d'amélioration d'un matériau. Par exemple, la bioprécipitation des cristaux $CaCO_3$ par *Bacillus sphaericus* est utilisée sur des surfaces calcaires à des fins de conservation (Dhami et al., 2014), et le rendement important de calcification par *Bacillus halodurans* est utilisé pour l'amélioration de la qualité du béton de granulats recyclés (Médevielle, 2017). Ainsi, l'implication reconnue de la calcification bactérienne dans les processus géologiques et dans d'importantes applications biotechnologiques a suscité l'intérêt de nombreux domaines de recherche. Des communautés bactériennes associées à des gisements de carbonate dans des mines colombiennes, et capables de calcification ont été identifiées et affiliées à 7 genres décrits : *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Strenotophomonas*, *Brevibacillus*, *Methylobacterium*, *Aeromicrobium* and *Acinetobacter* (García G et al., 2016). La précipitation de carbonate de calcium par des bactéries qui vivent au sein d'organes d'organismes supérieurs (e.g. les crustacés, les organismes marins, les plantes et les organes humains) a également été reportée, suggérant une potentielle relation symbiotique (Qin et al., 2020).

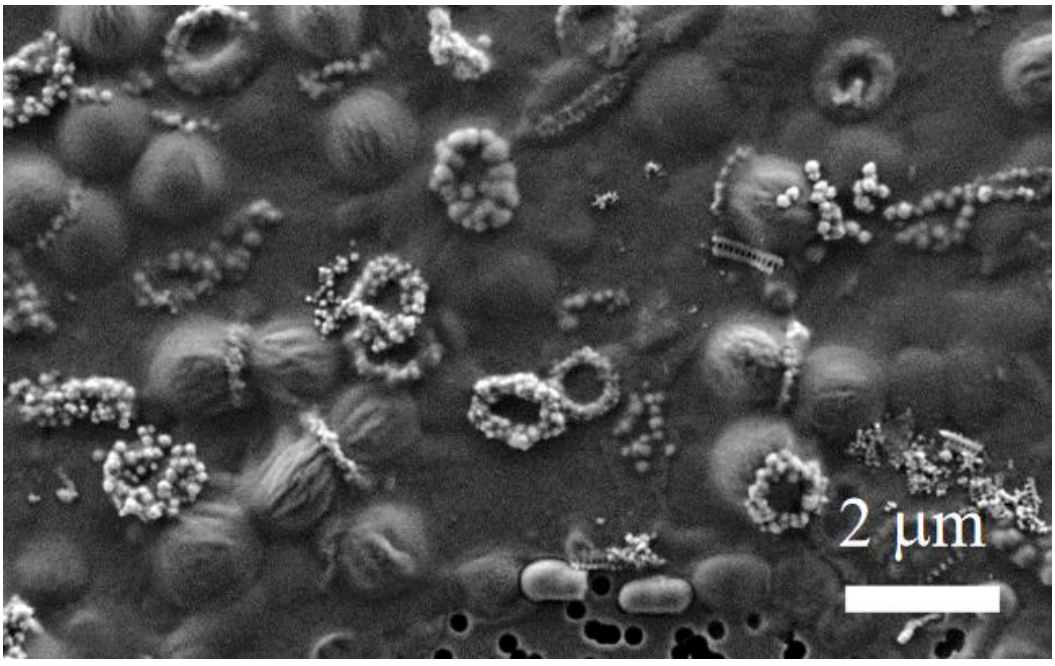


Figure 9 : Image de MEB des biominéraux extracellulaires sous forme d'anneaux de silicate (Fe, Mn) formés par des cellules de cyanobactéries en division. Benzerara *et al.* (2023)

1.3.3.2. Biominéraux intracellulaires

A l'inverse des précipités extracellulaires, les biominéraux **intracellulaires** sont produits par les procaryotes au sein de compartiments intracellulaires (e.g. vacuoles, vésicules) de manière à ce que la nucléation se produise à l'intérieur de la cellule, notamment *via* des activités métaboliques. Un compartiment intracellulaire représente un environnement chimique et local différent de l'environnement cytoplasmique, dans lequel le microorganisme exerce un contrôle sur la composition, la morphologie et la structure minéralogique. De manière générale et similaire aux eucaryotes, les biominéraux formés restent à l'intérieur de la cellule, mais certains peuvent être exportés de la cellule, comme pour les coccolithes. Les bactéries sont donc aussi capables de former des phases minérales intracellulaires, contenues dans des vésicules ou des corps cytoplasmiques. Parmi tous les biominéraux intracellulaires recensés, ces structures sont principalement composées de soufre, de phosphates, d'oxydes et de carbonates (Cosmidis and Benzerara, 2022). Parmi ces exemples, certains groupes bactériens ont été observés avec des structures biominéralisées composées de soufre élémentaire intracellulaires et des phases carbonatées (Park and Faivre, 2021; Yang et al., 2019), des larges inclusions de polyphosphates et des nanocristaux d'oxydes de Fer (magnétite) (Bidaud et al., 2021; Schulz-Vogt et al., 2019), des granules de carbonates de calcium amorphes (ACC) enrichies en AEM (Couradeau et al., 2012).

Les biominéraux intracellulaires formés par les bactéries peuvent être contenus dans de larges inclusions micrométriques. Toutefois, ils sont le plus souvent observés dans des inclusions nanométriques, d'où le terme « nano-inclusions » très souvent référencé. Plusieurs exemples de nano-biominéraux ont été recensés : les nano-cristaux de magnétite (i.e. magnétosomes) chez les MTB, les nano-inclusions de soufre élémentaire chez certaines bactéries pourpres sulfureuses, et les nano-inclusions d'ACC chez les cyanobactéries (Mansor and Xu, 2020) (**Figure 10**).

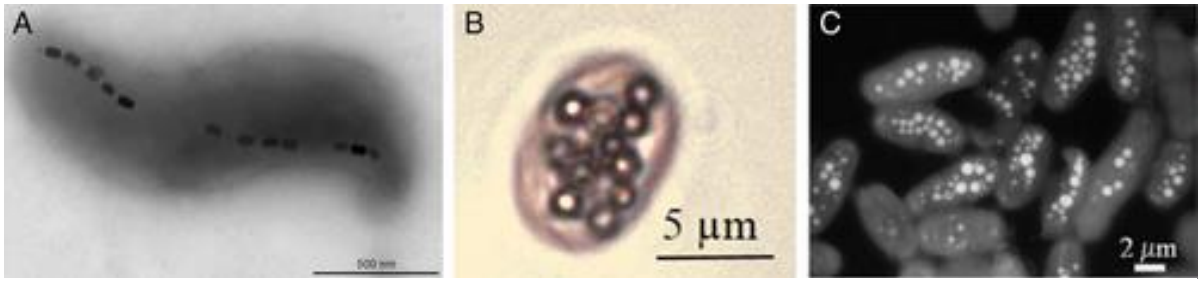


Figure 10 : Images de microscopie de nano-inclusions chez les bactéries. A) Nano-cristaux de magnétite dans la bactérie magnétotactique (MTB) *Magnetovibrio blakemorei* souche MV-1 (Abreu et Acosta-Avalos, 2018). B) Soufre élémentaire dans la bactérie pourpre sulfureuse *Chromatium okenii (*Danza et al., 2017). C) Inclusions de nano-carbonates dans la cyanobactérie *Cyanothece sp.* PCC 7425 (Benzerara et al., 2014). Mansor and Xu, 2020.

De nombreuses bactéries sulfo-oxydantes (exemple de la bactérie pourpre sulfureuse *Chromatium okenii* illustrée dans la Figure 10B) accumulent intracellulairement et utilisent le soufre élémentaire (S^0) comme (i) agent réducteur pour la libération du

sulfate, ou comme (ii) accepteur terminal d'électrons libérant du sulfure (Berg et al., 2014). Ce S^0 biogène peut être stocké sous différentes formes selon les espèces biologiques. Par exemple, certaines bactéries chimiotrophes stockent le S^0 sous forme de globules intracellulaires de cyclo-octasulfure (S^8) (Nims et al., 2019), alors que certaines bactéries stockent du S^0 de manière intracellulaire sous forme de chaînes de soufre, i.e. les polysulfures (Lee et al., 2007).

Dans un objectif de mieux comprendre les mécanismes de nucléation du biominéral intracellulaire et de caractériser son ultrastructure, certains auteurs ont entrepris des analyses permettant d'observer des coupes transversales de ces bactéries. Par exemple, des analyses en coupes fines de résine ou des analyses de cryo-microscopie électronique de coupes vitreuses (CEMOVIS) ont permis de visualiser la localisation exacte du minéral formé ainsi que son ultrastructure cellulaire. Par exemple, les nano-cristaux de magnétite sont systématiquement délimités par une bicouche lipidique (Gorby et al., 1988), tout comme les biominéraux de carbonate de calcium amorphe (ACC) chez les cyanobactéries avec une enveloppe membranaire dense aux électrons autour des granules d'ACC (Blondeau et al., 2018b). Ces biominéraux d'ACC ont donc été formés et stabilisés dans un micro-compartiment bactérien. **Ainsi, la présence d'une (bi)couche lipidique et/ou protéique semble être un élément important pour la création du minéral**.

1.4. Rôle des biominéraux dans le fonctionnement et l'adaptation des microorganismes

Chez les eucaryotes microbiens, les biominéraux sont formés par un processus de minéralisation contrôlée et ont des fonctions biologiques bien identifiées, telles que la structure (e.g. exosquelette), la protection (e.g coquilles), ou l'acquisition de nourriture. Toutefois, chez les procaryotes, le questionnement autour du ou des rôle(s) des biominéraux est un sujet continuellement discuté et diffère en fonction du type de biominéralisation et de sa localisation, d'autant plus que cette capacité peut être très variable chez un microorganisme selon les conditions environnementales et son état physiologique. Par exemple, des bactéries du genre *Beggiatoa* oxydent des éléments sulfurés (e.g. H_2S) en granules de S^0 dans des conditions riches en sulfure, tandis que dans des conditions de faible teneur en sulfures, le S^0 accumulé et stocké est oxydé en sulfate (Berg et al., 2014). De plus, le soufre intracellulaire peut être observé sous diverses formes minéralogiques (lorsqu'elles sont étudiées) : sous forme liquide, solide amorphe, ou micro-cristalline.

Certains auteurs ont décrit les processus de biominéralisation induite et influencée comme étant des mécanismes « accidentels et involontaires » par l'organisme et ne remplissant pas spécialement une fonction biologique. Néanmoins, cette hypothèse peut être discutée car de récentes études soulignent l'importance d'une coévolution du monde vivant avec le monde minéral et ont proposé une liste d'avantages potentiels de la biominéralisation procaryote (Cosmidis and Benzerara, 2022; Phoenix and Konhauser,

2008) (**Figure 11**) : (i) protection contre les rayonnements solaires nocifs, (ii) stockage des nutriments et/ou immobilisation des toxines, (iii) protection physique de la prédation (e.g. phagocytose) ou de la dessiccation et (iv) participation dans la résistance du biofilm et dans l'intégrité structurelle. D'autres fonctions possibles ont été proposées, tels que le transfert d'électrons extracellulaires, la détoxification de produits métaboliques nocifs, ou la conservation des potentiels thermodynamiques pour les réactions métaboliques (**Figure 12**) (Mansor and Xu, 2020).

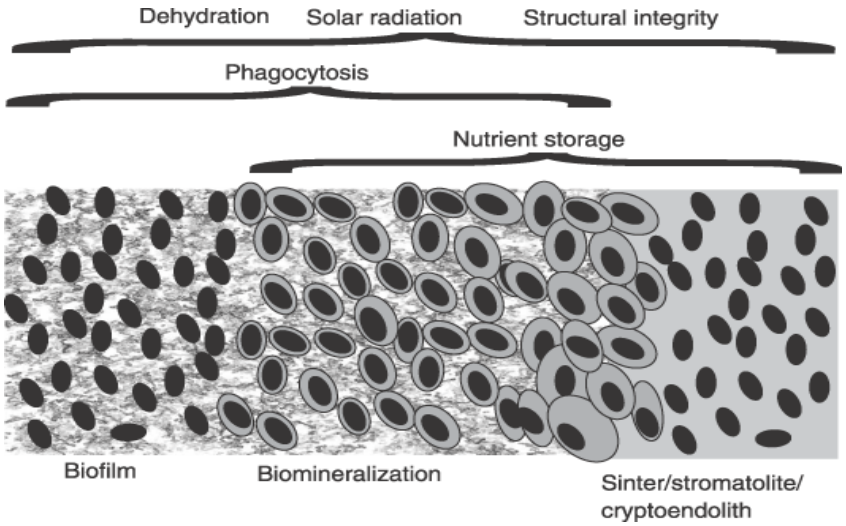


Figure 11 : Schéma résumant les principaux avantages procurés par les EPS (biofilms non minéralisés) et les biominéraux. Phoenix and Konhauser, 2008.

De manière plus générale, le processus de biominéralisation peut offrir une voie efficace afin de piéger les polluants inorganiques dans des phases minérales solides et relativement stables (Benzerara et al., 2011).

Des auteurs se sont intéressés de très près à ces questionnements et proposent de définir ce phénomène comme un « *trait biologique* », c'est-à-dire une « *caractéristique phénotypique qui peut être mesurable* » (Cosmidis and Benzerara, 2022). Le processus de biominéralisation peut donc être considéré à la fois comme une fonction biologique, ou seulement un trait biologique, ou les deux à la fois. Il est à noter que ces termes (i.e. fonction biologique ou trait biologique) peuvent avoir différentes significations selon les auteurs et le contexte de l'étude. Ces mêmes auteurs soulignent l'importance de redéfinir le terme de fonction biologique et le définissent comme un caractère qui a été sélectionné au cours de l'évolution pour son ou ses effets sur l'organisme. Néanmoins, d'autres auteurs parlent de « *fonction biologique* » comme des caractères qui ont été acquis de manière adaptative. **Finalement, attribuer une fonction à une structure ou un processus biologique reviendrait à pouvoir expliquer ses effets sur l'organisme et cette relation est souvent plus facile à établir dans les cas de biominéralisation intracellulaire**. C'est pourquoi, la formation de biominéraux par les microorganismes est un sujet de discussion en perpétuelle évolution.

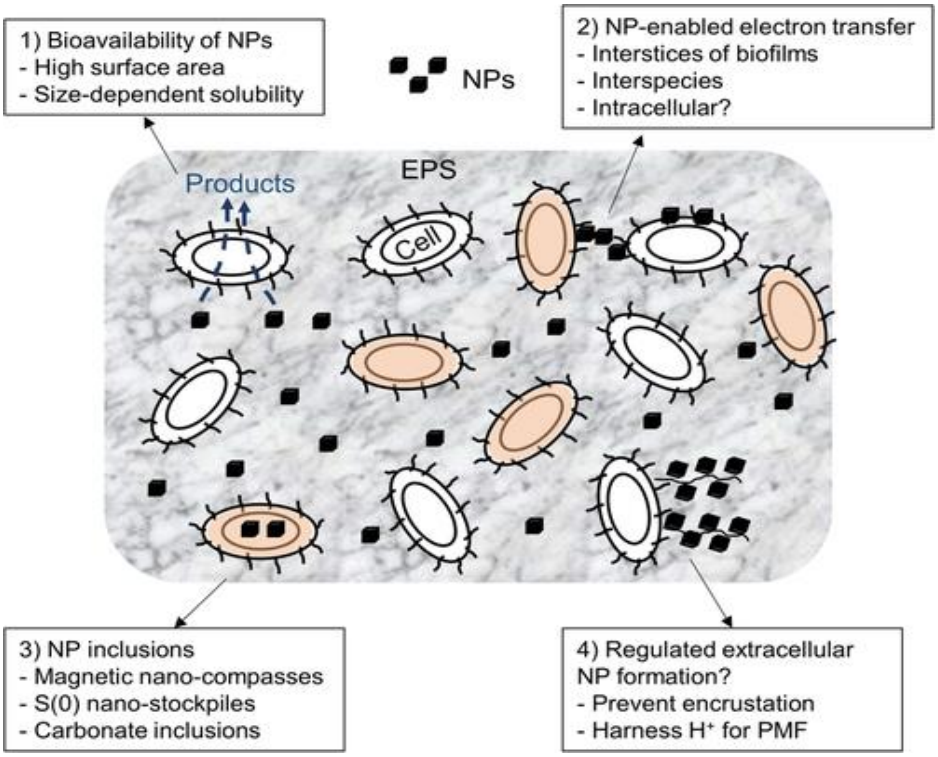


Figure 12 : Schéma résumant les différentes interactions bénéfiques des nanoparticules bactériennes dans l'environnement. Les cellules de couleur orange représentent différentes espèces. Abréviations : NPs (nanoparticules), EPS (substances polymères extracellulaires constituant un biofilm), PMF (Proton force motrice). Mansor and Xu, 2020.

2. Les bactéries magnétotactiques (MTB) : un cas de biominéralisation intracellulaire et contrôlée

2.1. Premières observations

Le cas le plus emblématique de biominéralisation contrôlée intracellulaire est surement celui des bactéries magnétotactiques (MTB). C'est en 1975 que Richard P. Blakemore les décrivait pour la première fois (Blakemore, 1975). Sous l'effet d'un champ magnétique, il mentionnait l'observation de bactéries aquatiques de type spirille (« *Uncultured magnetotactic spirillum* ») migrant vers le Nord dans des gouttes d'eau, le long des lignes du champ magnétique (Blakemore, 1975). Grâce à l'utilisation du microscope électronique, il a caractérisé l'ultrastructure cellulaire de ces bactéries et a remarqué la présence de plusieurs nanocristaux très denses aux électrons, enrichies en fer et regroupés en chaines (**Figure 13**).

Quatre années plus tard, R.P Blakemore, R.B Frankel et R.S Wolfe ont identifié la composition des cristaux intracellulaires comme étant de la magnétite (Fe_3O_4) notamment grâce à des analyses en spectroscopie Mössbauer (Frankel et al., 1979). Les premières descriptions indiquèrent que ces cristaux étaient contenus dans des vésicules intra-cytoplasmiques. Ces données valident l'hypothèse de Blakemore (1975) selon laquelle ces nanocristaux de fer servent de dipôles magnétiques et transmettent un

moment magnétique aux cellules leur permettant de nager et de s'orienter selon les lignes de champs magnétiques. Chez la grande majorité des bactéries observées et caractérisées par la suite, ces nanocristaux de Fe sont alignés en chaînes dans le cytoplasme et vont agir comme une aiguille de boussole en orientant les bactéries dans les champs magnétiques. C'est pourquoi ces bactéries sont capables de nager activement le long des lignes de champs magnétiques, un processus appelé magnétotaxie (Balkwill et al., 1980; Blakemore, 1975; Frankel et al., 1979).

Les recherches qui ont suivi les décennies suivantes, ont permis de progressivement caractériser ce nouvel organite procaryote: le magnétosome, qui se définit comme un cristal ferrimagnétique entouré d'une bicouche lipidique dotée de protéines membranaires (Gorby et al., 1988; Grünberg et al., 2004). Le déterminisme génétique sous-jacent, la machinerie moléculaire, le rôle écologique et l'évolution de cette voie de biominéralisation ont fait l'objet de recherches interdisciplinaires et représentent le cas le plus documenté de biominéralisation chez les procaryotes (Uebe and Schüler, 2016).

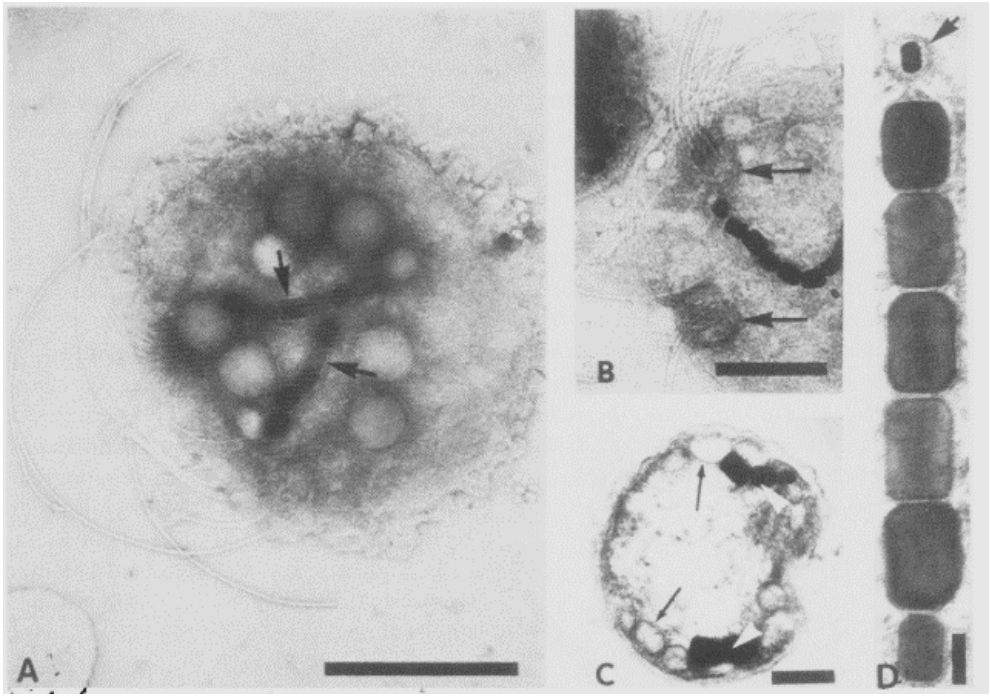


Figure 13 : Découverte et caractérisation morphologique de la première bactérie magnétotactique. Micrographies électroniques en transmission réalisées en 1975. A) Micrographie électronique d'une bactérie magnétique (échelle 0,5 µm). B) Micrographie électronique d'une partie d'une bactérie magnétique montrant les deux disques (flèches) dans lesquels les flagelles s'insèrent. C) Micrographie électronique d'une coupe fine d'une bactérie magnétotactique (échelle 0,25 µm) D) Micrographie électronique d'une chaîne de particules contenant du fer présente dans une cellule. Blakemore, 1975.

2.2. La magnétoréception chez le vivant

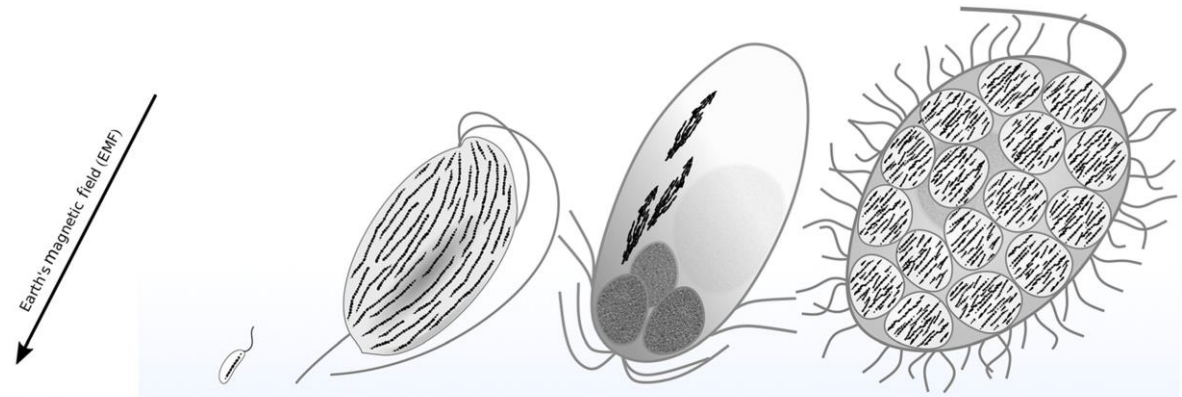
Au même titre que d'autres organites, les racines du mot « magnétosome » dérivent partiellement du grec ancien. Il est constitué du suffixe « soma » qui se traduit par « corps » et du préfixe « magneto » pour les propriétés magnétiques qui lui sont associées. Les

cristaux ferrimagnétiques contenus dans les magnétosomes confèrent aux bactéries la possibilité de s'orienter dans un champ magnétique. Définit comme la magnétoréception chez les eucaryotes, cette capacité est définie comme un sixième sens permettant à un être vivant de détecter l'intensité ainsi que l'orientation d'un champ magnétique (Bellinger et al., 2022; Monteil and Lefevre, 2020). Toutefois, le phénomène de magnétoréception n'est souvent pas considéré comme un sens *sensu lato* chez les bactéries car il y a un débat sur le caractère passif ou actif de ce trait, c'est à dire l'existence de récepteurs dédiés avec transduction du signal. Ainsi, la magnétoréception a pu être observée chez toutes sortes d'êtres vivants : des bactéries, des invertébrés comme le homard, mais aussi des vertébrés (e.g., saumon), chez certaines espèces d'oiseaux (e.g., pigeons voyageurs), de mammifères (e.g., chauve-souris), de tortues, papillons monarques, ou de requins (Begall et al., 2014; Clites and Pierce, 2017; Johnsen and Lohmann, 2008; Wiltschko and Wiltschko, 2012).

Bien que les organismes supérieurs soient connus pour utiliser le champ géomagnétique pour se géolocaliser, le mécanisme sensoriel impliqué dans la perception magnétique reste encore très mal compris. Trois hypothèses tentent de proposer les différents mécanismes chez les eucaryotes : (1) la présence d'un magnétorécepteur à base de magnétite sensible à la mécanique (2) un mécanisme chimique sensible à la lumière, ou (3) l'induction électromagnétique au sein de structures accessoires qui transforment les stimuli magnétiques en informations électriques (Nordmann et al., 2017). Des recherches ont observé la présence de cristaux de magnétite chez de nombreux organismes comme le saumon récemment qui pourraient soutenir la première hypothèse (Bellinger et al., 2022). Néanmoins, la preuve de magnétite ne semble pas suffisante pour expliquer ce sens, car les oxydes de fer sont présents dans tous les environnements et peuvent éventuellement être une source de contamination pour toutes les observations réalisées.

Comme vu précédemment (section 1.3.2, **Figure 7**), certains eucaryotes unicellulaires sont magnétoréceptifs ou magnétiquement sensibles par différents moyens (**Figure 14**). De nombreuses observations et preuves expérimentales montrent que certains ciliés peuvent être guidés magnétiquement après la prédation de MTB, tandis que certains flagellés ont acquis ce sens par symbiose avec des bactéries magnétiques (Monteil et al., 2019; Monteil and Lefevre, 2020). Parallèlement, une étude suggère que certains protistes magnétotactiques pourraient biominéraliser les cristaux magnétiques, bien qu'il manque encore des preuves pour vraiment le valider.

En revanche, les mécanismes associés à la magnétoréception sont bien mieux connus chez les bactéries magnétotactiques (**Figure 13**). La capacité de magnétoreception chez ces bactéries est expliquée par la biominéralisation des nanocristaux de magnétite (nano-aimants) au sein des magnétosomes qui grâce à leur moment magnétique et leur alignement, exercent un mouvement de torque (i.e. torsion autour du point central) sur la cellule et changent son orientation dans l'espace (Monteil and Lefevre, 2020).



Organism	Magnetotactic bacteria	Magnetotactic holobiont	Magnetotactic protist	Magnetic protist
Size range	1 μm–15 μm	~16 μm	~23 μm	~22 μm
Habitat	Microoxic-Anoxic Saline/freshwater sediments	Anoxic Marine sediments	Unknown redox settings Freshwater sediments	Oxic-Microoxic-Anoxic Marine sediments
Orientation of navigation	Parallel or antiparallel to the EMF	Antiparallel to the EMF	Parallel to the EMF	Parallel to the EMF
Origin of magnetoreception	Biomineralization of prokaryotic origin	Eukaryote-prokaryote ectosymbiosis	Biomineralization of eukaryotic origin?	Grazing of magnetotactic bacteria
Mineral biomineralized	Magnetite or greigite	Magnetite	Magnetite	Magnetite

Figure 14 : Représentation schématique de la morphologie et des comportements magnétiques chez les microrganismes eucaryotes magnétoréceptifs. Les chaines de magnétosomes sont représentées en noir. L'orientation antéro-postérieure de l'organisme est donnée par rapport à la direction du champ magnétique terrestre (EMF) dans l'hémisphère Nord. Ces orientations sont inverses pour les micro-organismes de l'hémisphère sud. Monteil et Lefèvre (2020).

2.3. Magnétotaxie et niches écologiques

Les MTB utilisent la magnétoréception pour guider leur navigation le long des lignes du champ géomagnétique. Cette navigation est réalisée par (i) la biosynthèse de magnétosomes permettant un alignement passif des bactéries parallèle aux lignes de champ magnétique mais également par (ii) l'activité du ou des flagelles, permettant une migration active le long des lignes de champ et (iii) un système de chimioaérotactisme (Frankel et al., 1997). L'ensemble de ces processus a permis de définir ce comportement sous le terme de « magnétotaxie » (Bazylinski and Frankel, 2004) qui a évolué vers celui de « magnétoaéro-chimiotaxie ». En effet la mobilité des MTB est plus contrôlée par des systèmes de chimiotactisme et en particulier l'aérotactisme, guidée par le champ magnétique et non par une action d'aimantation (Frankel et al., 1997; Lefèvre et al., 2014). L'aérotaxie est définie comme la réponse par laquelle les bactéries se déplacent vers une teneur optimale d'oxygène dans un gradient d'oxygène (Taylor et al., 1999).

Les MTB ont donc la capacité de se déplacer dans la zone optimale de concentration en oxygène, généralement au-dessus ou en-dessous de l'OATZ (Uebe and Schüler, 2016) ce qui explique qu'on les trouve systématiquement dans les environnements stratifiés chimiquement (**Figure 15**). Toutefois, les facteurs physico-chimiques (e.g. dioxygène, lumière, température) agissent comme des signaux pour les bactéries, et selon la présence de récepteurs spécifiques et de leur sensibilité, elles vont pouvoir détecter le signal. La transduction du signal le mieux connu est le chimiotactisme (i.e. attraction ou répulsion de la bactérie par des substances chimiques) et la diversité de ces mécanismes de tactisme (ou taxie) n'est pas exclue. En effet, le terme de magnéto-aérotactisme a été décrit car les premières souches de MTB caractérisées étaient principalement microaérophiles. Toutefois, il y a eu depuis un grand nombre de MTB décrites comme strictes anaérobes (e.g. BW-1, les procaryotes multicellulaires magnétiques MMPs, les MTB alcalophiles) (Abreu et al., 2014, 2007; C.T. Lefèvre et al., 2011; Pikuta et al., 2003; Trubitsyn et al., 2014; Wenter et al., 2009). Pour ces MTB, la magnéto-redoxtaxie pourrait être un mécanisme plus approprié pour comprendre l'avantage primaire apporté par les magnétosomes dans les zones de forts gradients, à proximité de l'OATZ. Le fonctionnement de la magnétotaxie et l'avantage apporté aux MTB contient encore de nombreuses zones d'ombre, ci-dessous les connaissances de cette fonction bactérienne proviennent d'études conduites sur les quelques souches modèles cultivées.

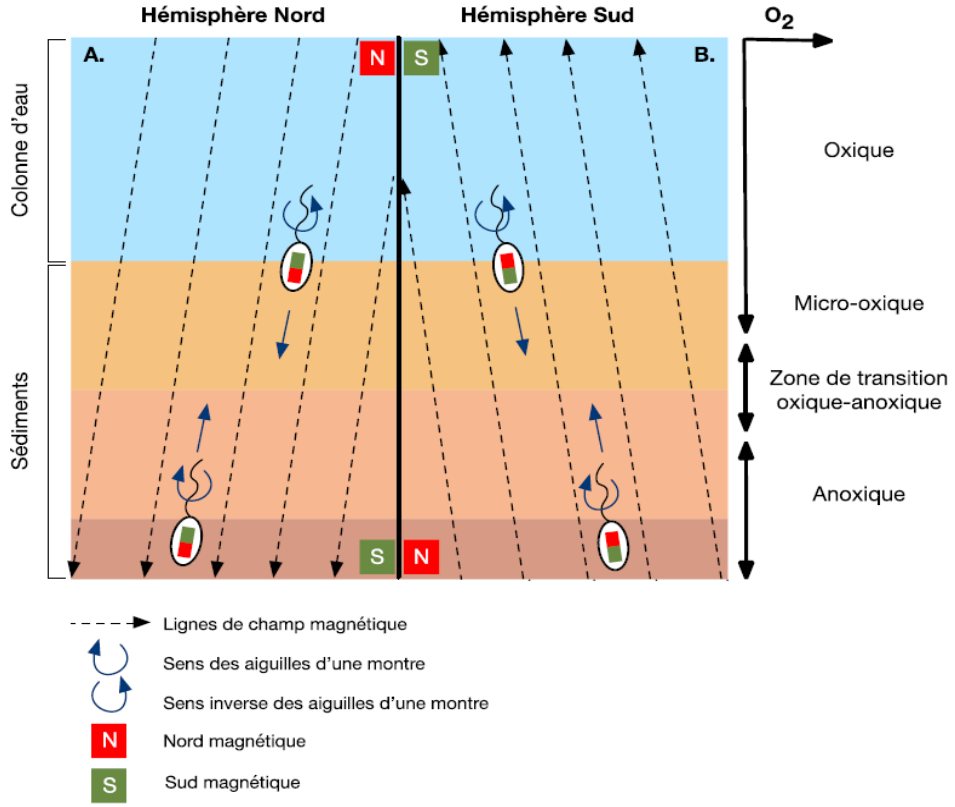


Figure 15 : Schéma illustrant le modèle de magnéto-aérotaxie. A) MTB dans l'hémisphère Nord nageant vers le sud magnétique. B) MTB dans l'hémisphère Sud nageant vers le nord magnétique. Figure de Descamps *et al.* (2018) et inspirée de Uebe & Schuller (2016).

La magnéto-aérotaxie est également associée à un autre paramètre important : la polarité magnétique de la cellule. Dans leur environnement naturel, la magnéto-aérotaxie des MTB est décrite comme étant « polaire ». C'est-à-dire qu'en présence d'oxygène, la bactérie peut nager en direction du Nord géographique (MTB *north-seeking*) et vers le Sud géographique (MTB *south-seeking*) (Uebe and Schüler, 2016). Dans certains cas particuliers, tels que chez les deux souches modèles les plus étudiées *Magnetospirillum magneticum* souche AMB-1 et *M. gryphiswaldense* souche MSR-1, la polarité peut totalement disparaitre dans des milieux de culture sans gradients. Les bactéries vont ainsi nager et se déplacer sans avoir une préférence de pôle (Frankel et al., 1997), elles sont dites axiales. D'autres recherches ont montré qu'un changement de potentiel redox peut induire un inversement de polarité (Zhang et al., 2010). Le magnétotactisme contient en réalité différents types de mécanismes ; initialement les mécanismes polaire et axiale avaient été décrits à partir de l'étude de *Magnetospirillum* et de *Magnetococcus marinu*s souche MC-1, mais plus récemment, il a été montré qu'il y avait une plus grande diversité des mécanismes de la magnétotaxie, avec l'étude d'autres souches à l'ultrastructure et la physiologie différentes (Lefèvre et al., 2014). Ces mécanismes étant vraisemblablement dépendants de la physiologie de la bactérie, de la nature du gradient perçu et du type de senseur associé.

Les bactéries magnétotactiques sont distribuées dans de nombreux environnements aquatiques et sédimentaires et partagent quelques caractéristiques communes. Les MTB sont toutes (i) des bactéries à Gram négatif, (ii) mobiles avec la présence de flagelles, (iii) capables de biosynthétiser des magnétosomes et (vi) microaérophiles et/ou anaérobes. C'est pourquoi, elles sont généralement confinées dans des environnements présentant une stratification chimique verticale, au niveau de la zone de transition oxique-anoxique (OATZ) (Bazylinski et al., 1995; Bazylinski and Lefèvre, 2013; Faivre and Schüler, 2008; Flies et al., 2005) (**Figure 16**). En effet, plusieurs études témoignent de leur ubiquité à l'échelle planétaire dans les OATZ dans plusieurs continents et océans du monde. Les MTB nichent dans cette zone de microaérobie, où la teneur en oxygène est particulièrement faible mais n'est pas pour autant nulle. C'est pourquoi les MTB sont principalement connues pour être des bactéries microaérophiles, bien que certaines soient des anaérobes strictes (**Figure 16**). Elles sont, de ce fait, communément appelées « gradient-loving bacteria »(Lefèvre and Bazylinski, 2013).

Les espèces cultivées en laboratoire sont soit microaérophiles, soit anaérobes, soit les deux (Lefèvre and Bazylinski, 2013). Les alpha- et gammaprotéobactéries sont connues pour être généralement microaérophiles et peuvent croître en (i) chimiolithoautotrophie en utilisant des composés inorganiques comme sources d'électrons et de carbone (ii) chimioorganohétérotrophie en utilisant des acides organiques comme sources d'électrons et de carbone (Bazylinski and Williams, 2007). Certains peuvent faire

différentes combinaisons des deux modes trophiques. En revanche, les deltaprotéobactéries sont décrites comme des anaérobes sulfato-réductrices et semblent se développer de manière chimioorganohétérotrophique (Lefèvre and Bazylinski, 2013). Certaines espèces de MTB sont également connues pour posséder une activité nitrogénase en fixant l'azote atmosphérique, et certaines, telles que les espèces du genre *Magnetospirillum*, ont la capacité d'être dénitrifiantes (Lefèvre and Bazylinski, 2013). Bien que les MTB représentent généralement un faible pourcentage d'abondance microbienne dans les écosystèmes aquatiques, elles ont été suggérées comme étant des acteurs importants intervenant dans la transformation chimique du fer, de l'azote, du soufre et du carbone (W. Lin et al., 2014; Simmons and Edwards, 2006).

Bien qu'il existe des niches écologiques spécifiques aux MTB, certaines ont été retrouvées dans des environnements assez contrastés. En effet, ce groupe de bactéries est connu pour se développer à des pH neutres ainsi que des températures modérées (Lefèvre and Bazylinski, 2013). Des MTB ont néanmoins été observées dans des environnements extrêmes : au niveau de sources d'eaux chaudes atteignant des températures de 63°C (Lefèvre et al., 2010), dans des environnements hypersalins (Bazylinski and Lefèvre, 2013), alcalins (Lefèvre et al., 2011), acides (Abreu et al., 2018), froids (Abreu et al., 2016) et profonds (Dong et al., 2016).

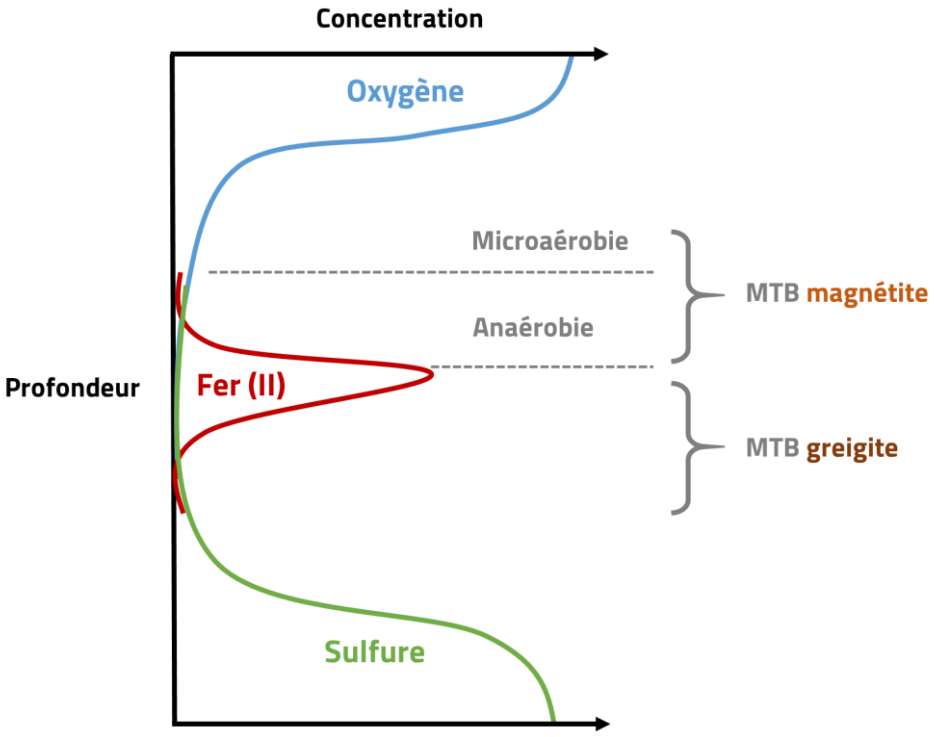


Figure 16 : Représentation schématique des gradients chimiques dans une colonne d'eau. Les bactéries productrices de magnétite peuvent vivre dans des zones microaérobies ou anaérobies tandis que les bactéries productrices de greigite nécessitent la présence de sulfure en conditions anaérobiques. MTB = bactéries magnétotactiques. Inspiré de Faivre & Schuller (2008).

2.4. Diversité morphologique, phénotypique et métabolique

Depuis leur découverte, de nombreuses recherches soutiennent que les bactéries magnétotactiques forment un groupe polyphylétique (i.e. tous ses membres ne partagent pas un ancêtre commun direct) dont la diversité phénotypique et phylogénétique a longtemps été sous-estimée et l'est probablement encore (Goswami et al., 2022). La caractérisation de nouvelles espèces est réalisée directement à partir d'échantillons environnementaux après une étape de concentration par tri magnétique, et dans certains cas par la mise en culture des bactéries. Alors que l'étude de la diversité était réalisée initialement sur des MTB cultivables, elle est désormais essentiellement faite à partir de techniques dites indépendantes de la culture. La caractérisation génétique et biochimique des processus moléculaires impliqués dans la formation des magnétosomes a été essentiellement réalisée par l'étude des deux souches modèles affiliées à la classe des *Alphaproteobacteria*, *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 (Matsunaga et al., 1991) et *M. gryphiswaldense* MSR-1 (Schleifer et al., 1991).

Les premières différences morphologiques ont été observées grâce à des outils de microscopie. En effet, les MTB ont des morphologies très diversifiées : forme sphérique de type coccus, forme incurvée de type vibrion, forme de bâtonnet, forme spiralé de type spirille, et des morphotypes multicellulaires (Amann et al., 2007; Lefèvre and Bazylinski, 2013; W. Lin et al., 2014; Spring et al., 1993) (**Figure 17**).

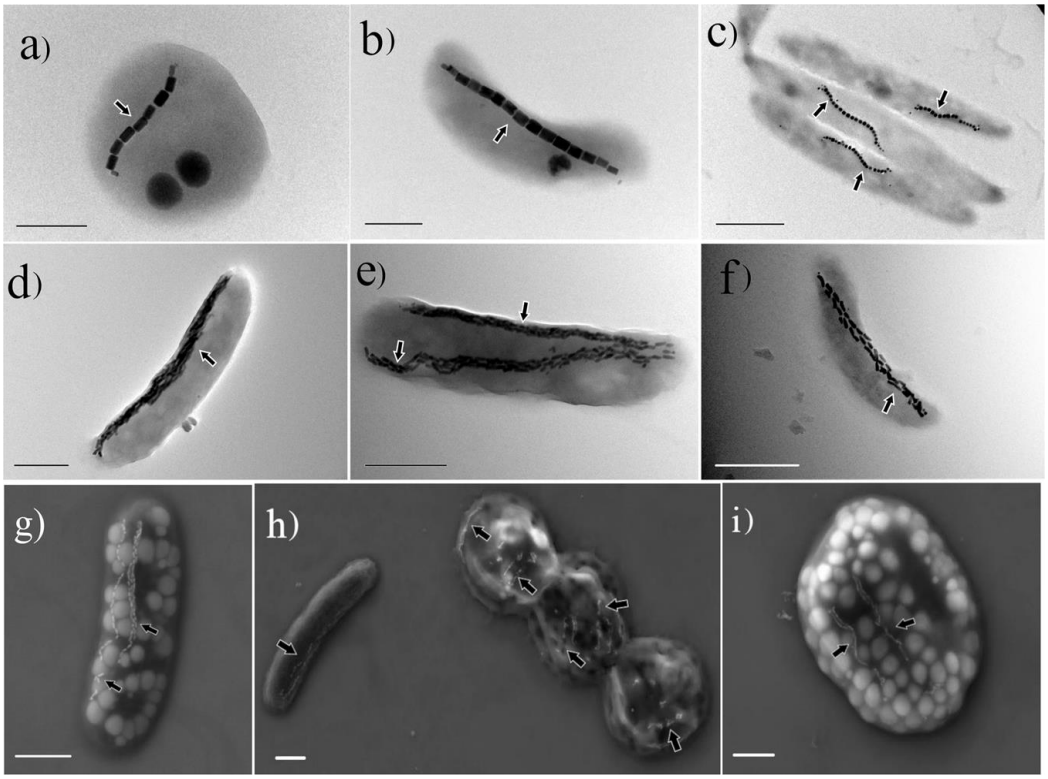


Figure 17 : Diversité phénotypique des MTB montrant les différents arrangements des chaines de magnétosomes, la morphologie des magnétosomes, la morphologie cellulaire. Images de microscopie électronique en transmission (MET) (a-f) et de microscopie électronique à balayage (MEB) (g-i) de MTB ayant une morphologie et des magnétosomes variés. Les barres d'échelle représentent 0.5 µm (a, b) et 1 µm (c-i). Goswami *et al.* (2022).

Des approches de microscopie couplées à des analyses chimiques ont permis d'observer une diversité minéralogique chez les MTB. En effet, les MTB sont capables de synthétiser des nanocristaux intracellulaires composés de magnétite (Fe_3O_4) ou de greigite (Fe_3S_4) (Bazylinski et al., 1995; Descamps et al., 2017; Lefèvre and Bazylinski, 2013). Les MTB sont connues pour synthétiser quatre morphologies différentes de magnétosomes : cubo-octaédrique, prismatique (allongé ou rectangulaire), en forme de dent ou en forme d'ogive (Amor et al., 2020). La minéralisation étant strictement contrôlée, l'espèce bactérienne est en général systématiquement associée à un type de cristal (i.e. morphologie et/ou composition) et une organisation/polarité (**Figure 18**). Toutefois, il existe des exceptions quand à cette conclusion. Par exemple, certaines espèces de *Thermodesulfobacteria spp.* (anciennement *Deltaproteobacteria*) sont capables de former deux types de cristaux dans deux conditions environnementales données (Descamps et al., 2017; Li et al., 2020c) : (i) cristaux de magnétite en forme de balle de fusil et (ii) cristaux de greigite en forme de cuboctaèdre (**Figure 18**).

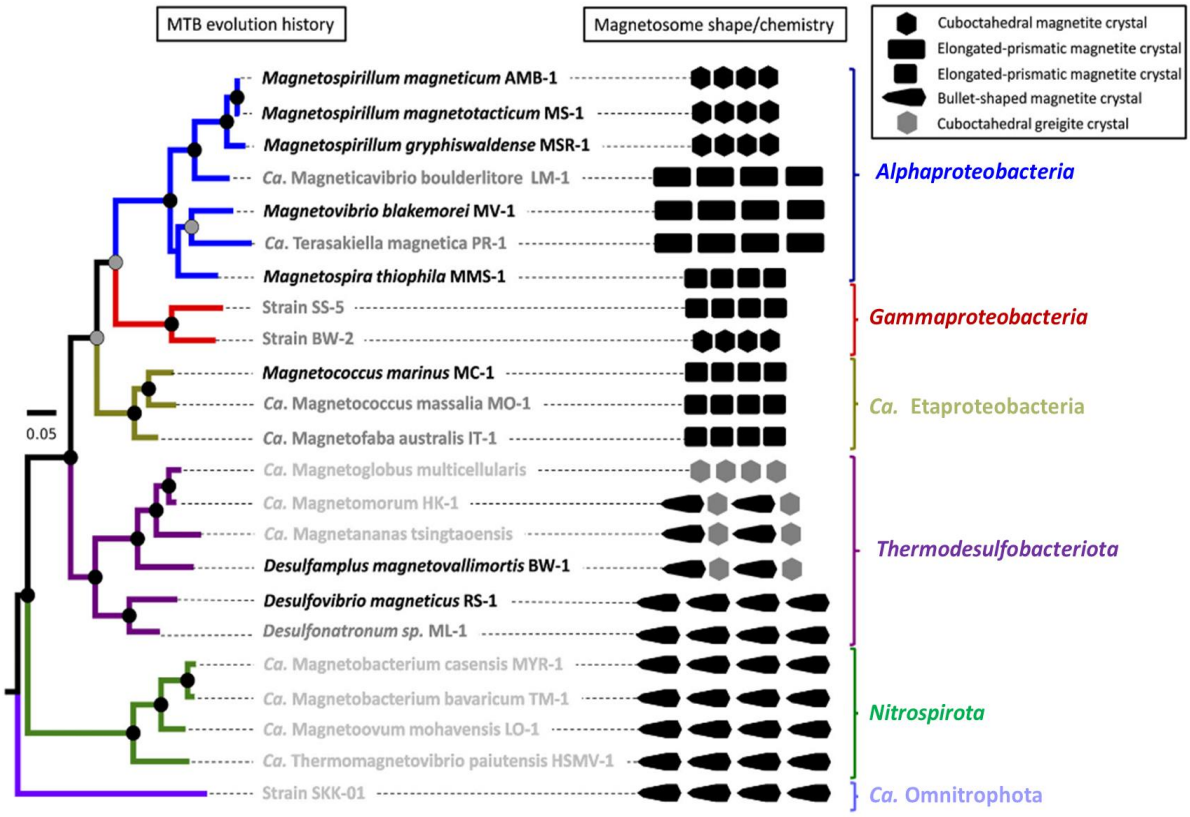


Figure 18 : Corrélation entre l'évolution des MTB, la morphologie et la composition des magnétosomes. L'arbre du maximum de vraisemblance a été construit à partir des séquences du gène de l'ARNr 16S de certaines MTB pour lesquelles les magnétosomes ont déjà été caractérisés. L'arbre a été raciné avec la souche SKK-01 appartenant au phyum des *Omnitrophota*. Les MTB cultivées et taxonomiquement caractérisées sont en gras, les MTB cultivées mais non encore taxonomiquement caractérisées sont en gris foncé et les MTB non cultivées sont en gris clair. D'après Amor *et al.* (2020). Les rangs taxonomiques suivants ont été mis à jour : *Thermodesulfobacteriota*, *Nitrospirota*, et *Omnitrophota*.

Les études phylogénétiques ont permis de regrouper la diversité des MTB au sein de plusieurs taxons. Les MTB sont affiliées taxonomiquement dans les classes des *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Candidatus* Magnetococcia (en cours de validation, anciennement proposé en tant que *Ca.* Etaproteobacteria) au sein de l'embranchement des *Pseudomonadota*. Mais on retrouve également des MTB dans plusieurs embranchements anciens « *deep branching* » comme les *Thermodesulfobacteriota,* les *Nitrospirota* et les *Omnitrophota* (Amor et al., 2020; Descamps et al., 2016; Lefèvre and Bazylinski, 2013; Lin et al., 2017) (**Figure 18**).

Plus récemment, les progrès réalisés dans les approches de métagénomique ou de génomique *single-cell*, les études de terrain à grande échelle et la disponibilité publique de certaines métadonnées (e.g. Tara Ocean) ont permis d'augmenter significativement le nombre total d'espèces et de phyla contenant des MTB (Lin et al., 2018, 2020b; Uzun et al., 2020). Avant 2012, les MTB étaient affiliées à seulement deux embranchements de *Pseudomonadota* et *Nitrospirota* (anciens *Proteobacteria* et *Nitrospirae*). Des MTB au sein l'embranchement *Omnitrophota* (anciennement *Candidatus* Omnitrophica) ont été découvertes entre 2012 et 2015. Par la suite, des MAGs de MTBs non décrits ont été affiliés à deux embranchements *Candidatus* Latescibacteria et *Planctomycetota*, sur la base de la présence de clusters de gènes codant pour la formation des magnétosomes dans leur génome. Enfin, l'apport des études de métagénomique depuis 2017 et l'évolution de la classification avec la classification GTDB a étendu la distribution des MTB à un total de seize lignées bactériennes (**Figure 19**) (Lin et al., 2017, 2018, 2020b; Uzun et al., 2020, 2022, 2023).

Cet apport de connaissances a donc révolutionné les hypothèses précédentes suggérant que l'origine évolutive de la magnétotaxie était monophylétique. Ainsi la diversité taxonomique et génomique des MTB augmente et évolue rapidement dans l'ensemble du domaine *Bacteria* (Goswami et al., 2022).

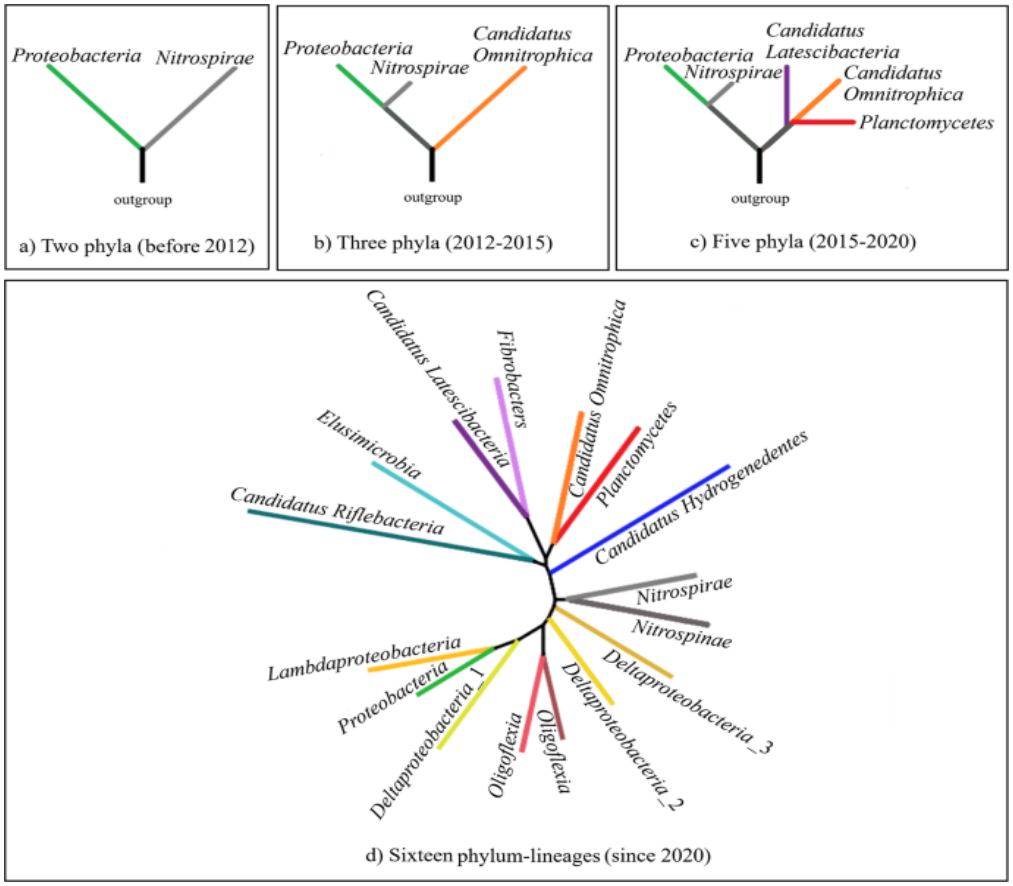


Figure 19 : Représentation schématique de l'arbre phylogénétique des bactéries magnétotactiques parmi le domaine *Bacteria*. A) Avant 2012, seuls deux phylums (anciens *Proteobacteria* et *Nitrospirae*) étaient identifiés comme étant des MTB. B) Entre 2012 et 2015, une branche supplémentaire pour le phylum *Candidatus* Omnitrophica a été ajoutée. C) Par la suite, deux embranchements bactériens (*Candidatus* Latescibacteria et Planctomycetes) ont été ajoutés à l'arbre des MTB sur la base de la présence de clusters de gènes de magnétosomes dans leurs génomes. D) Depuis 2020, les études de métagénomique et l'utilisation de la classification GTDB, ont fait passer le nombre de phylums contenant des MTB à seize. Goswami *et al.*, 2022.

En relation avec cette diversité taxonomique et sa distribution polyphylétique, on peut trouver une grande diversité métabolique chez les MTB (**Figure 20**). La faible épaisseur de l'OATZ créé un environnement très localisé, où sont concentrées localement des espèces chimiques réduites et oxygénées. Cette niche permet la cohabitation de microorganismes et types trophiques très variés.

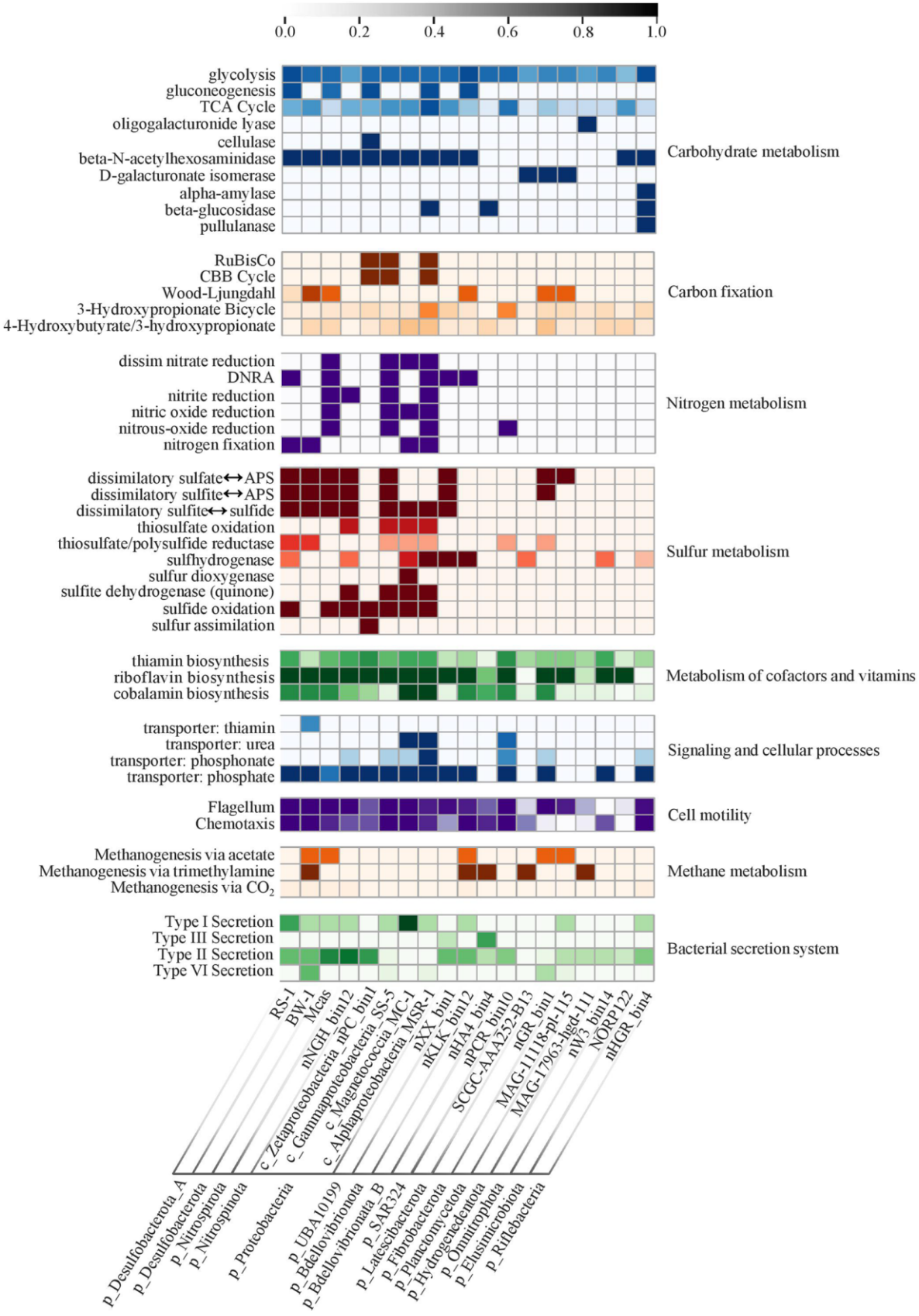
Le métabolisme des MTB varie selon l'appartenance taxonomique, la disponibilité des éléments chimiques dans l'environnement naturel et les facteurs physico-chimiques (e.g. gradients chimiques, température, luminosité). Les MTB peuvent utiliser différents accepteurs terminaux d'électrons (e.g. oxygène, nitrate, protoxyde d'azote, sulfate), différents donneurs d'électrons inorganiques (e.g. composés sulfurés réduits tels que le sulfure d'hydrogène ou le thiosulfate, l'hydrogène) ou organiques (e.g. formate, succinate) et une source de carbone organique ou inorganique. Certaines MTB affiliées au *Nitrospirota* peuvent adopter différentes stratégies métaboliques suivant les conditions redox du milieu environnant. Par exemple, *Ca*. Magnetobacterium casensis et *Ca*. Magnetobacterium bavaricum sont capables d'oxyder le soufre en utilisant le nitrate et/ou l'oxygène comme accepteur terminaux d'électrons au niveau de l'OATZ et

d'effectuer la réduction du sulfate dans la zone inférieure anoxique (Li et al., 2020a; W. Lin et al., 2014b).

Les 16 lignées bactériennes contenant des MTB peuvent être chimio-organo-hétérotrophes (voir définition des types trophiques dans la partie 3.5.1) et utiliser les acides organiques comme source de carbone et d'électrons par le biais de la glycolyse, du cycle de l'acide citrique (TCA) et de la voie de n-acetyl-beta-hexosaminidase (notamment chez les *Thermodesulfobacteriota*, *Pseudomonadota* et *Nitrospirota*) (**Figure 20**).

Les MTB sont également capables de fixer l'azote, d'oxyder ou de réduire le soufre et de séquestrer le carbone inorganique et le phosphore de l'environnement (Lefèvre and Bazylinski, 2013). Le métabolisme du soufre est très utilisé par les MTB. En effet, la réduction du soufre *via* la présence de l'intermédiaire adénosine 5'-phosphosulfate (APS) permettant la réduction du sulfate (en sulfite ou en sulfure) semble plus spécifique au *Thermodesulfobacteriota*, *Nitrospirota* et *Pseudomonadota* qu'aux autres phylums (voie absente ou incomplète) (**Figure 20**). Dans certains cas, ces souches sont également capables d'oxyder le soufre, notamment les MTB affiliées aux *Pseudomonadota*.

Si l'on s'intéresse aux mécanismes de séquestration du carbone inorganique par les MTB (i.e. autotrophie), certaines espèces peuvent être chimio-litho-autotrophes. Il existe une voie métabolique clé appelée CBB (Calvin-Benson-Bassham) rendant possible la séquestration du carbone biodisponible par les organismes. Cette voie fait intervenir l'enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) catalysant la réaction de fixation du CO_2 (Paoli et al., 1995). Des séquences codantes pour le gène *cbbM* (codant pour la RuBisCO) ont été identifiées dans les souches magnétotactiques chimio-litho-autotrophes telles que *Magnetovibrio* (e.g. MV-1 et MV-2) et dans la plupart des souches affiliées au genre *Magnetospirillum* (e.g. MS-1, MSR-1, AMB-1) suggérant que ces espèces auraient un rôle important dans la fixation du carbone (Bazylinski et al., 2004; Geelhoed et al., 2010; Monteil et al., 2020). Une séquence partielle de ce gène est également trouvée chez deux souches de *Gammaproteobacteria* magnétotactiques (BW-2 et SS-5) suggérant qu'elles utilisent la voie CBB pour l'autotrophie (Lefèvre et al., 2012) (**Figure 20**). Les *Magnetococcales* dont tous les membres sont magnétotactiques représentés par la souche type *Magnetococcus marinus* MC-1, semblent utiliser le cycle inverse de l'acide tricarboxylique (rTCA) lorsqu'elles sont autotrophes. Enfin, les MTB affiliées aux *Nitrospirota* semblent utiliser les voies de l'acétyl-CoA réducteur et/ou de rTCA pour fixer le CO_2 (W. Lin et al., 2014; Zhang et al., 2021).



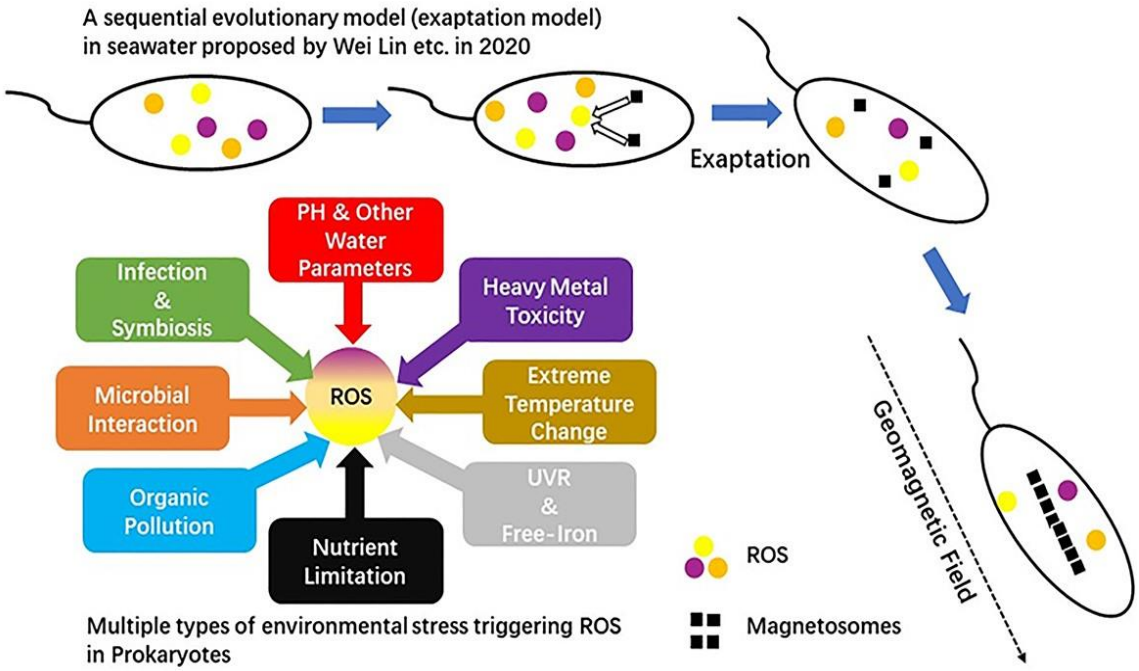
<u>Figure 20</u> : Voies métaboliques des génomes représentatifs de MTB à travers 16 lignées bactériennes au niveau du phylum. Le dégradé de couleurs représente la complétude des principales voies métaboliques déduites de la présence ou de l'absence de gènes. La couleur foncée représente une voie complète ou presque complète, et la couleur blanche représente une voie absente ou incomplète. La plupart des génomes de MTB disponibles sont incomplets, n'excluant pas que l'absence ou le caractère incomplet des voies métaboliques puisse être dû à la nature fragmentée des génomes. Tous les groupements taxonomiques sont basés sur la classification GTDB. (Goswami *et al*., 2022).

2.5. Rôle adaptatif et scénarios sur l'histoire évolutive de la magnétotaxie

Bien que notre connaissance des mécanismes physiologiques de la magnétoréception ait considérablement progressée au cours des dernières décennies, l'origine de ce comportement reste encore une question fondamentale. En effet, nous ne connaissons pas les étapes évolutives ayant conduit à la formation des magnétosomes tels qu'ils sont formés et génétiquement codés dans les lignées modernes. Les MTB forment un groupe polyphylétique : elles sont représentées par des espèces distribuées dans plusieurs embranchements, classes, familles, genres et espèces dont les membres ne sont pas tous capables de former des magnétosomes. C'est pourquoi l'origine et le transfert de gènes impliqués dans la formation des magnétosomes sont discutés continuellement.

Le rôle adaptatif de la biominéralisation des magnétosomes est également un questionnement en perpétuelle évolution.

Une étude publiée en 2020 soutient que la biominéralisation des magnétosomes aurait évolué à partir d'un mécanisme de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) déclenchées par le rayonnement ultra-violet (UVR) (**Figure 21**) (Lin et al., 2020a). La synthèse de nanoparticules de fer peut avoir ensuite été sélectionnée comme capteur magnétique pour la magnétoréception chez les micro-organismes. Ce scénario soutient donc que l'origine de la magnétoréception microbienne serait le résultat d'un processus évolutif d'exaptation (i.e. processus d'adaptation d'un caractère, selon lequel une ou plusieurs fonctions peuvent s'ajouter à sa fonction d'origine ou la remplacer). Une autre étude de 2023 est en accord avec cette hypothèse mais suggère que différents types de stress environnementaux, autre que les UVR, ont pu déclencher l'évolution du magnétosome et être à l'origine de son existence (**Figure 21**) (Yang et al., 2023). En effet, de nombreux types de stress environnementaux peuvent entrainer la présence de ROS dans la cellule et, par conséquent, déclencher l'évolution précoce du magnétosome chez les procaryotes (**Figure 21**). Ainsi, outre la fonction de magnétotaxie, d'autres fonctions ont été attribuées aux magnétosomes telles que la détoxification ou l'élimination des espèces réactives toxiques de l'oxygène (ROS), la séquestration et le stockage du fer pour agir comme une batterie électrochimique (Byrne et al., 2015), ou comme un capteur de gravité (Lin et al., 2020b).



<u>Figure 21</u> : Hypothèses sur les divers types de stress environnementaux à l'origine de l'émergence et l'évolution du magnétosome, développée à partir du modèle d'exaptation proposé par Wei Lin et al. en 2020. Plusieurs types de stress environnementaux peuvent provoquer des ROS, et déclencher l'évolution des magnétosomes chez les procaryotes. Bien que la vie soit originaire de l'eau de mer, l'évolution des premiers magnétosomes a pu se produire plusieurs fois à différents endroits de la Terre, une fois que la vie a été soumise aux ROS. Yang et al (2023).

Bien qu'il existe une seule origine moléculaire avec la conservation dans tous les génomes des MTB de 8 gènes essentiels à la formation des magnétosomes, deux scénarios persistent sur l'évolution des MTB : (1) l'hypothèse d'une évolution verticale et d'un ancêtre commun à toutes les MTB (Lefèvre et al., 2013a; Lin et al., 2017b), et (2) l'hypothèse d'une évolution horizontale, c'est-à-dire *via* des transferts horizontaux de gènes (HGT) entre les différentes lignées bactériennes (Monteil et al., 2020, 2018; Uzun et al., 2022; Wang and Chen, 2017) (**Figure 22**).

La première hypothèse semble indiquer que les MTB partagent toutes un ancêtre commun ayant existé avant la divergence des phylums des *Pseudomonadota* et des *Nitrospirota*. Les gènes impliqués dans la magnétotaxie auraient été perdus au fil de l'évolution chez la plupart des descendants non magnétotactiques, expliquant que certains groupes taxonomiques au sein d'un même phylum contenant des MTB ne partagent pas ces gènes. Cette hypothèse n'est pas validée par la majorité de la communauté scientifique, soutenant qu'il est peu probable que la perte de gènes ancestraux soit le moteur de l'évolution des MTB, compte tenu du nombre important d'évènements de délétion impliqués.

A contrario, d'autres auteurs soutiennent qu'il est plus probable que les transferts horizontaux de gènes (HGT) aient été le moteur de propagation des gènes de la magnétotaxie parmi les différentes lignées. Cette deuxième hypothèse est largement plus validée (bien qu'elle soit encore contestée) car des expériences génétiques appuient cette proposition. En effet, des souches de bactéries initialement non magnétotactiques

peuvent produire des magnétosomes après le transfert par une approche de génétique, des gènes impliqués dans la magnétotaxie (i.e. transformation génétique) (Dziuba et al., 2023; Kolinko et al., 2014). Seulement quelques gènes sont nécessaires pour que la bactérie devienne magnétotactique, suggérant que cet évènement de HGT ait pu se réaliser dans des conditions naturelles. Aujourd'hui, la vérité est surement quelque part entre les deux scénarios (**Figure 22**).

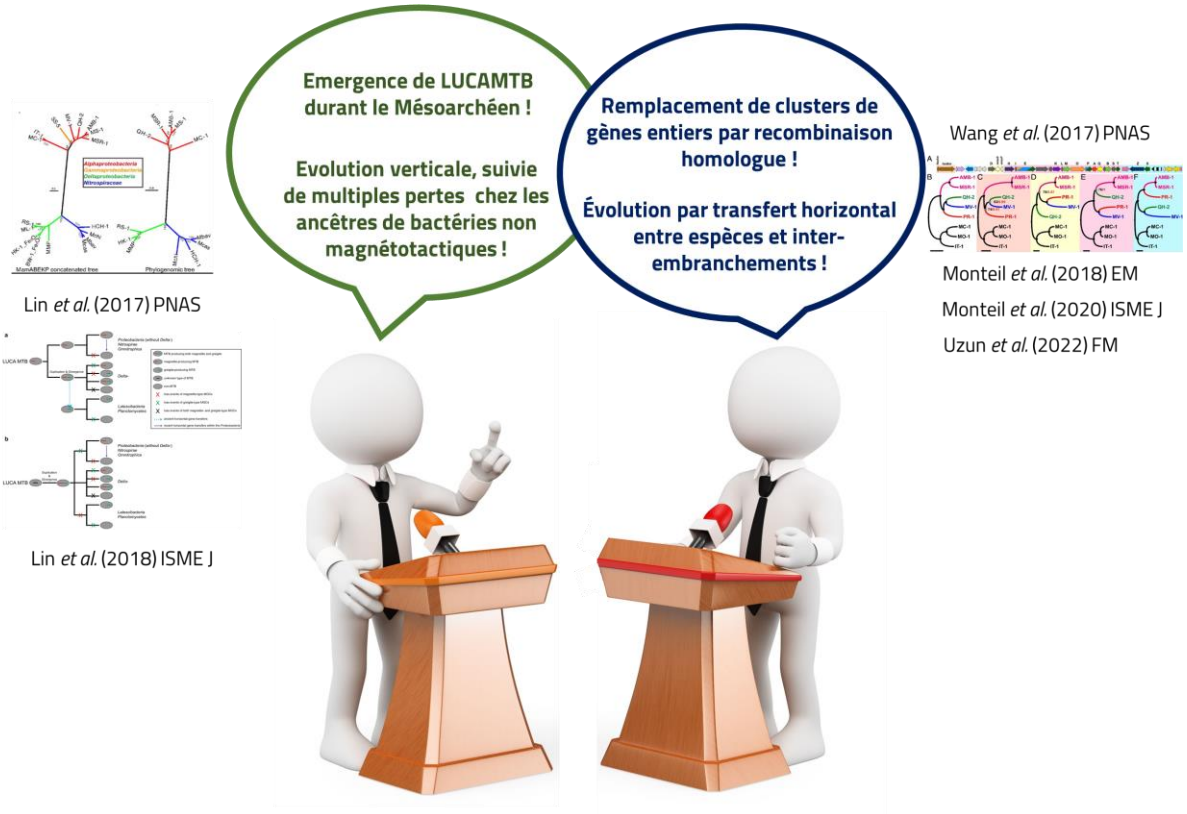


Figure 22 : Deux scénarios sur l'origine évolutive des MTB et les études associées au débat. A gauche, en vert, le scénario proposant une évolution verticale. A droite, en bleu, le scénario proposant une évolution horizontale. La vérité se situant certainement au milieu.

2.6. Bases génétiques et fonctionnelles de la formation des magnétosomes

Les mécanismes moléculaires sont bien décrits et ont fait l'objet de nombreux articles en biochimie, génétique et biophysique depuis les années 90. Le genre bactérien le plus étudié chez les MTB est celui des *Magnetospirillum* (Grünberg et al., 2004; Komeili et al., 2006; Lefèvre et al., 2012; Li et al., 2010; Scheffel et al., 2006; Schleifer et al., 1991; Yang et al., 2023). En effet, les *Magnetospirillum spp*. sont facilement cultivables et sont génétiquement manipulables. La toute première MTB à avoir été isolée en culture axénique était *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 (Blakemore et al., 1979). Par la suite, la plupart des travaux étudiant la biosynthèse des magnétosomes ont utilisé des souches modèles *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 et *M. gryphiswaldense* MSR-1 dont les génomes complets ont été séquencés dans le début des années 2000.

Les mécanismes de biosynthèse des magnétosomes ont été analysés grâce à ces souches par des méthodes de génétique moléculaire, des analyses de génomique comparatives et l'étude phénotypique des lignées mutantes obtenues après la délétion de certains gènes. C'est l'analyse comparée des génomes de souches MSR-1 magnétiques et non magnétiques qui a permis initialement d'identifier une région contenant les gènes nécessaires à la synthèse des magnétosomes (Grünberg et al., 2004, 2001; Schübbe et al., 2003). Chez les MTB, cette région est appelée « **îlot de magnétotaxie** » (MAI de l'anglais *magnetosome island*) ou « **cluster de gènes codant pour la magnétotaxie** » (MGC de l'anglais *magnetosome gene cluster*). Chez MSR-1, cette zone correspond à un îlot génomique comprenant une quarantaine de gènes regroupés en cinq opérons : *mms6*, *mamGFDC*, *mamAB*, *mamXYZ* et *feoAB* entourés d'éléments de mobilité (Grünberg et al., 2004; Schübbe et al., 2003) (**Figure 23**). Cependant, cette structure en cinq opérons n'est pas systématiquement retrouvée dans toutes les classes et génomes de MTB. Un ensemble de 8 gènes/fonctions semble être obligatoire et présent chez toutes les bactéries, i.e. ceux représentés par l'opéron *mamAB* (Lefèvre et al., 2013b; Lohsse et al., 2011). Certains gènes spécifiques aux *Magnetospirillum* ne sont pas retrouvés dans les autres génomes de MTB, tandis que d'autres gènes sont spécifiques à d'autres phyla comme les gènes *mad* chez les *Thermodesulfobacterota* et les gènes *man* chez les *Nitrospirota* (Uzun et al., 2020, 2022). Il existe même un cluster de gènes spécifiques à la formation de greigite (Lefèvre et al., 2013b). Ainsi, même si les mécanismes de formation des magnétosomes semblent être dirigés par un même groupe de gènes, il existe plusieurs gènes redondants fonctionnellement.

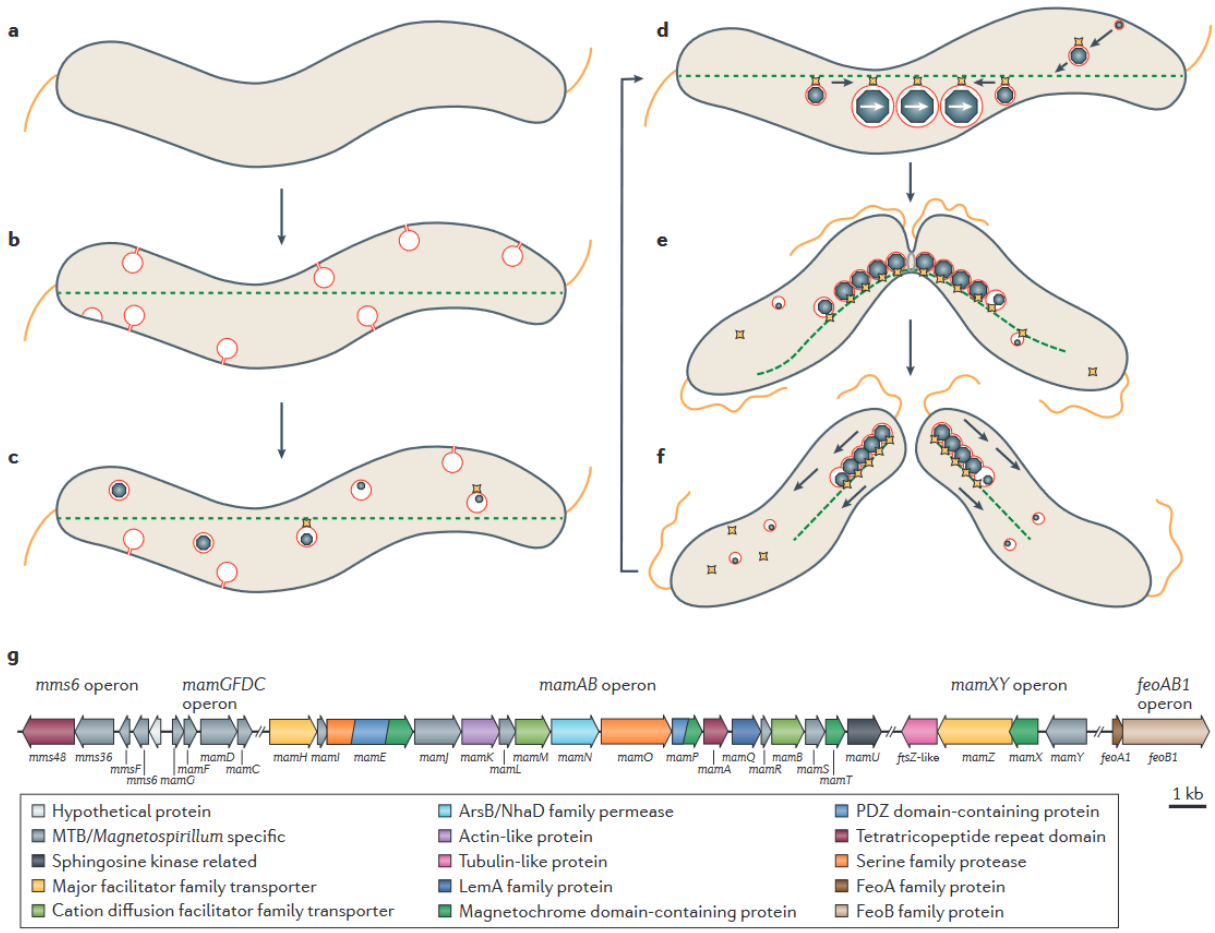


Figure 23 : Modèle schématique des étapes de formation des magnétosomes et organisation des gènes de l'îlot de magnétotaxie (MAI) chez l'alphaproteobactérie magnétotactique MSR-1 (Uebe et schuler 2016).

Selon l'étude de la souche modèle MSR-1, la biogenèse des magnétosomes suit différentes étapes chronologiques suivantes (**Figure 23**). Tout d'abord, (1) la membrane du magnétosome est invaginée à partir de la membrane cytoplasmique, formant des invaginations permanentes semblables à des vésicules. Ensuite (2) avant, pendant ou après l'invagination, les protéines du magnétosome sont adressées à la membrane du magnétosome. Puis (3) le fer est transporté dans l'invagination de la membrane du magnétosome et minéralisé sous forme de cristaux de magnétite. Enfin, (4) une chaîne de magnétosomes est assemblée et positionnée le long de l'axe le plus long de la cellule jusqu'à sa ségrégation pendant la division cellulaire (**Figure 23**) (Uebe and Schüler, 2016).

Différentes protéines sont impliquées différemment dans chacune de ces étapes. Dans les grandes lignes :

(1) Les protéines MamB, I, L, Q et Y participeraient à l'invagination de la membrane interne de la cellule, et MamA et E au tri des protéines.

(2) MamJ et K participeraient à l'alignement des magnétosomes en chaînes (**Figure 23D**).

(3) FeoAB1, MamB, E, H, M, N, O, P, T, X, Z et FtsZm seraient impliquées dans des processus tels que le transport du fer, la nucléation et le contrôle de l'environnement chimique.
(4) FeoAB1, MamZ, FtsZm ainsi que MamC, D, F, G, X, Y, Mms6,MmsF, Mms36 seraient impliquées dans le contrôle de la taille et de la morphologie des particules magnétiques (Uebe and Schüler, 2016).

La gestion de l'incorporation, de la transformation du fer et de son homéostasie globale sont des étapes clés au cours de la formation des magnétosomes, durant lesquelles de nombreuses réactions chimiques sont impliquées en parallèle. Une étude récente a proposé un modèle regroupant l'ensemble des voies permettant la minéralisation du fer par les MTB (Amor et al., 2020). Ce modèle est divisé en 4 étapes principales : (1) absorption du fer, (2) stockage cellulaire du fer, (3) livraison du fer aux vésicules des magnétosomes et (4) nucléation et formation de la magnétite (**Figure 24**).

Les MTB peuvent absorber du Fe(II) ou du Fe(III) de leur environnement selon certaines conditions. L'assimilation du Fe(III) nécessite parfois la biosynthèse de sidérophores, tandis que chez certaines souches, cette incorporation de Fe(III) est indépendante des sidérophores (Amor et al., 2018). Une fois incorporé, le fer est stocké dans la cellule sous la forme de Fe(III). Si c'est le Fe(II) qui est incorporé, le fer est donc entièrement oxydé lors de l'internalisation (**Figure 24**). Des protéines de stockage du fer, telles que la ferritine, ont été identifiées dans les souches modèles. Ces dernières ont la capacité de réduire le fer, pour que ce dernier soit transporté vers les magnétosomes, puis précipité sous forme de magnétite (Fe_3O_4) (Faivre et al., 2007). Le Fe(II) est ensuite transporté vers les vésicules des magnétosomes matures à travers la membrane du magnétosome (**Figure 24**). Des gènes codants pour des transporteurs de Fe(II) appartenant à l'opéron *feoAB* se trouvent à proximité des gènes impliqués dans la formation des magnétosomes dans tous les génomes de MTB.

Enfin, les précurseurs de la magnétite pourraient être des particules oxydées telles que la ferrihydrite ou l'hématite. Le Fe(II) transporté vers les magnétosomes devrait donc être oxydé pour la précipitation de ces précurseurs (Amor et al., 2018). La protéine MamP semble être utilisée pour les réactions d'oxydation et a été détectée dans la membrane du magnétosome (Siponen et al., 2013). Une fois l'oxydation du fer, la magnétite se formerait ensuite lors de l'ajout de Fe(II) dans les magnétosomes (**Figure 24**). Toutefois, ce processus est discuté car une étude suggère que les protéines de stockage du fer ne sont pas impliquées dans la minéralisation et que la ferrihydrite ne représente pas un précurseur de la magnétite (Uebe et al., 2019). Les protéines auraient donc une toute autre fonction (i.e. protection contre le stress oxydatif).

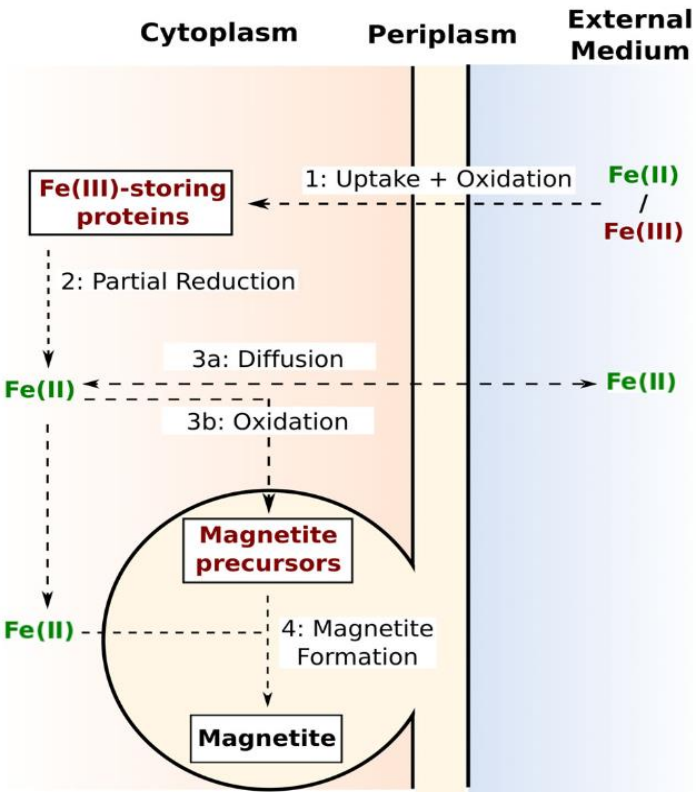


Figure 24 : Mécanismes chimiques et protéiques conduisant à la minéralisation du fer dans la MTB. Amor *et al* (2020)

2.7. Diversité des autres structures intracellulaires par les MTB

Outre la biominéralisation des magnétosomes, certaines bactéries magnétotactiques (MTB) ont également été observées avec des structures intracellulaires associées à la concentration de divers éléments tels que le **phosphore**, le **magnésium**, **carbone**, le **soufre**, le **calcium** et la **silice** (Li et al., 2021; Taoka et al., 2014). Les contrôles environnementaux du stockage intracellulaire de ces éléments chimiques chez les MTB sont généralement peu décrits dans la littérature. En effet, ces inclusions n'ont pas fait l'objet d'études approfondies pour comprendre leur nature et leur origine dans la plupart des cas. Par exemple, une étude dans la Seine (France, Paris) a montré la présence de MTB non cultivées contenant de potentielles inclusions d'oxyde riches en baryum et en calcium (Isambert et al., 2007).

La synthèse de nano- et micro-inclusions a également été reportée chez les MTB, notamment les **globules de soufre élémentaire (S^0)** (Keim et al., 2005; Lefèvre et al., 2012; Li et al., 2021; Rivas-Lamelo et al., 2017; Su et al., 2023), des **globules de (poly)phosphate enrichies en Mg et/ou Ca** (Bidaud et al., 2021; Li et al., 2021; Liu et al., 2021; Rivas-Lamelo et al., 2017; Schulz-Vogt et al., 2019), des **inclusions de polyhydroxybutyrates (PHB)** (Gorby et al., 1988), des **vacuoles vides et/ou riches en azote** (e.g. stockage du nitrate)(Li et al., 2021, 2020b; Zhao et al., 2023), et des **inclusions**

riches en Ca, Ba et même du carbonate de calcium ($CaCO_3$) (Isambert et al., 2007; Liu et al., 2021; Monteil et al., 2021; Taoka et al., 2014). Les MTB pourraient donc être des modèles d'études pour comprendre (i) les mécanismes et les fonctions des biominéraux intracellulaires chez les procaryotes (ii) les mécanismes de séquestration chimiques chez les MTB. En effet, les caractéristiques morphologiques et chimiques de ces biominéraux ainsi que leur fonction cellulaire au sein des MTB sont encore très méconnues. Toutefois, les récentes découvertes d'autres types d'inclusions chez les MTB semblent courantes et attirent l'attention de scientifiques en dehors de la communauté MTB.

La bioaccumulation d'espèces chimiques d'intérêt, par des organismes magnétiquement dirigeables, pourrait ouvrir des perspectives pour des applications biotechnologiques (Dziuba et al., 2023; Vargas et al., 2018). Par exemple, une souche de MTB (WYHS-1) a été observée avec trois types d'inclusions intracellulaires autres que des magnétosomes : des globules de soufre (S^0), des granules de polyphosphate riches en Ca et Mg (**Figure 25A**). Contrairement aux magnétosomes, les autres types d'inclusions ne sont pas toujours observés au sein de la cellule, suggérant un rôle potentiel de stockage ou de transport des éléments chimiques de manière temporaire, en fonction des besoins métaboliques de la cellule. Plus rarement, la découverte d'inclusions de grande taille chez les MTB a engendré des questionnements quant aux rôles de ces dernières, compte tenu de l'espace qu'elles occupent au sein du cytoplasme. Par exemple, une « MTB géante » (GRS-1) a été observée avec de grosses inclusions (pouvant mesurer jusqu'à 4,5 µm de large) enrichies en calcium, occupant la majeure partie de l'espace cellulaire (Taoka et al., 2014) (**Figure 25B**).

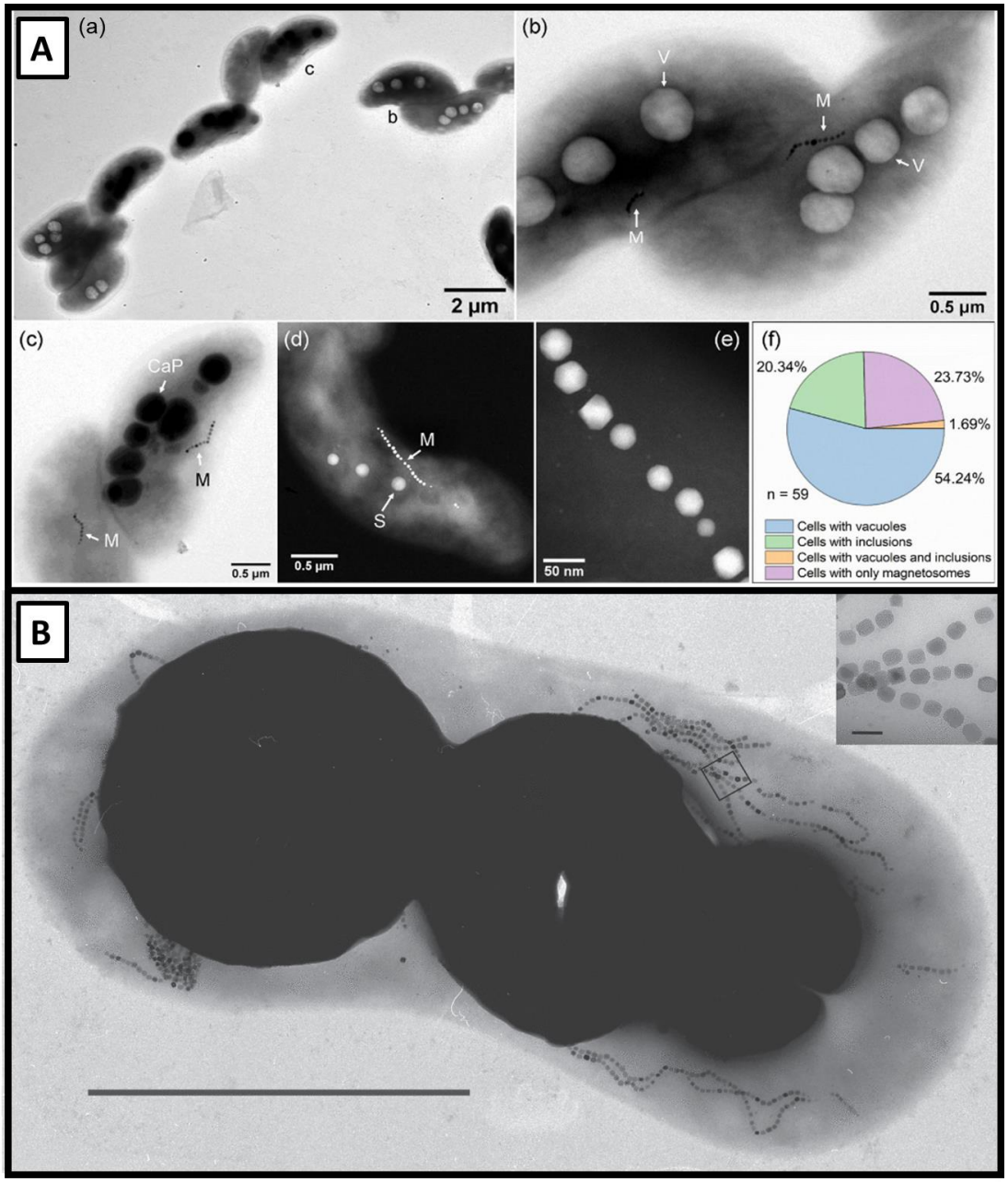


Figure 25 : Accumulation d'autres structures intracellulaires que les magnétosomes chez les MTB. A) Caractéristiques morphologiques et chimiques des inclusions chez la souche de MTB WYHS-1. (a-e) Images de microscopie électronique en transmission (MET) de plusieurs cellules WYHS-1 avec diverses inclusions intracellulaires. (f) Proportion des cellules avec vacuoles, avec des inclusions, avec vacuoles et inclusions, et avec seulement les magnétosomes. Li *et al*. (2021) B) Image de MET d'une gammaprotéobactérie magnétotactique géante (GRS-1) illustrant plusieurs chaînes de magnétosomes et de grosses inclusions denses aux électrons, occupant la majeure partie du volume intracellulaire. Taoka *et al*. (2014)

D'autre part, certains compartiments cytoplasmiques ne contiennent pas de substances minérales et sont entièrement organiques. Chez les MTB, la plupart des corps organiques connus sont des inclusions lipidiques, telles que les polyhydroxyalkanoate (PHA) (Keim et al., 2005; Rivas-Lamelo et al., 2017; Silva et al., 2008; Su et al., 2023). La synthèse de ces inclusions lipidiques est parfois favorisée selon certains paramètres physico-chimiques. Par exemple, une souche de MTB modèle (*Magnetospirillum magneticum* AMB-1) est capable de synthétiser des inclusions de PHA et de PolyP (**Figure 26**) (Su et al., 2023) et l'exposition à l'oxygène semble être favorable à leurs formations,

suggérant un potentiel lien entre les métabolismes du carbone, de l'oxygène et du phosphore chez les MTB. Ces découvertes soulèvent des questionnements, notamment sur l'existence de conditions chimiques pouvant induire la formation de granules intracellulaires. La localisation intracellulaire de ces structures internes minérales et organiques et les mécanismes génétiques et enzymatiques associés à leur biosynthèse suggèrent qu'il y a un contrôle génétique strict sur leur formation. Bien que le mécanisme moléculaire sous-jacent ne soit pas clair, il est possible que l'oxygène soit dans certains cas un signal chimique déclenchant la biosynthèse de magnétosomes, de PHA et de PolyP (Su et al., 2023).

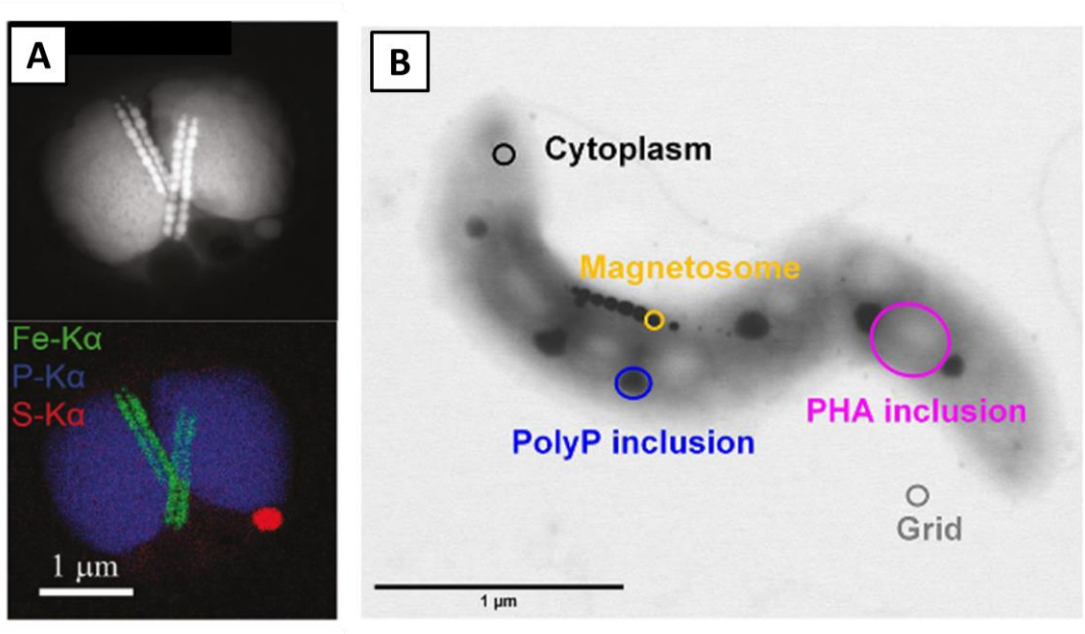


Figure 26 : Des MTB avec de multiples structures intracellulaires. A) Images de STEM-XEDS d'une MTB en forme de coccus (MTBc) avec deux doubles chaine de magnétosomes, deux larges inclusions de polyP, une petite inclusion de soufre, et deux vacuoles vides (possiblement du soufre ayant été vaporisé sous le faisceau d'électrons). Rivas-Lamelo et al (2017). B) Image de MET d'une souche de MTB (AMB-1) formant des petites inclusions de PolyP, de PHA et une chaine de magnétosomes. Su *et al.* (2023)

3. La biominéralisation des carbonates par les bactéries

A ce jour, il existe une grande diversité de phases minérales carbonatées extracellulaires ou intracellulaires pouvant être formées par des bactéries dont les différents polymorphes de carbonate de calcium peuvent être : la calcite, l'aragonite et la vatérite, des carbonates de calcium hydratés comme la monohydrocalcite, des carbonates amorphes (Ca, Sr, Ba, Ra), dolomite (Ca-Mg-CO_3), hydromagnésite ($Mg_5(CO_3)_4(OH)_2 \cdot 4H_2O$) ou sidérite ($FeCO_3$) (Görgen et al., 2020).

Le processus de carbonatogenèse a souvent été considéré comme extracellulaire et non contrôlé (Cosmidis and Benzerara, 2022; Görgen et al., 2020). De nombreux exemples d'organismes eucaryotes et procaryotes mentionnés dans les sections précédentes

soutiennent cette affirmation. Par exemple, certaines bactéries sont capables de biominéraliser des carbonates extracellulaires par la formation de roches (e.g. stromatolites) (Couradeau et al., 2012) et de microbialites précipitées à la fois par les communautés microbiennes avec leur environnement physico-chimique (Iniesto et al., 2021). La **carbonatogenèse extracellulaire** est ainsi mieux documentée que les mécanismes intracellulaires et les acteurs microbiens majeurs impliqués sont les bactéries photosynthétiques, telles que les cyanobactéries. L'exemple le mieux décrit à ce jour est celui des précipitations extracellulaires formées par un consortium microbien composé de cyanobactéries. La **carbonatogenèse intracellulaire**, bien qu'elle soit moins décrite, semble être une voie de biominéralisation très répandue parmi les cyanobactéries (Benzerara et al., 2014; Blondeau et al., 2018b) et quelques espèces du genre *Achromatium* (Benzerara et al., 2021).

Bien que la formation de phases carbonatées par les bactéries ait été observée chez plusieurs espèces (e.g. carbonatogenèse bactérienne), ce cas de biominéralisation intracellulaire semble être un cas beaucoup moins documenté que celle de la magnétite chez les bactéries magnétotactiques. Jusqu'à 2012, seulement des références sur la biominéralisation d'ACC étaient trouvées pour *Achromatium* (Babenzien, 1991; Babenzien and Sass, 1996, p. 19; Benzerara et al., 2021; De Boer et al., 1971, p. 19; Glöckner et al., 1999; Gray et al., 2004; Gray, 2006; I. M. Head et al., 2000; Ionescu et al., 2017, 2020; Mansor et al., 2015; Salman et al., 2015; Schewiakoff W, 1893; Schorn et al., 2020; Yang et al., 2019). En effet, une cinquantaine d'articles a été publiée sur cette bactérie. Depuis 2012 et la découverte des ACC chez les cyanobactéries, la thématique de biominéralisation des ACC a connu un nouvel essor avec de nombreuses études publiées (Benzerara et al., 2022, 2014; Blondeau et al., 2018b; Cam et al., 2017, 2016, 2015; Couradeau et al., 2013a, 2013b, 2012; De Wever et al., 2019; Gaëtan et al., 2022; Jansson and Northen, 2010; Li et al., 2016; Mehta et al., 2019; Moreira et al., 2016) avec une vingtaine de publications parues sur les cyanobactéries produisant des iACC. Enfin, au laboratoire, nous espérons que la découverte des MTB produisant des iACC permettra de nourrir cette thématique de la carbonatogenèse bactérienne, avec pour le moment un article en cours de publication, et un deuxième à venir à la suite de mes travaux de thèse.

3.1. Le cas particulier des cyanobactéries formant des microbialites

Les microbialites sont des roches sédimentaires emblématiques formées par des communautés microbiennes phylogénétiquement et métaboliquement complexes qui prospèrent dans des conditions physicochimiques spécifiques. Ces roches carbonatées d'origine microbienne peuvent être organisées en différentes structures : léiolite (aphanitique), stromatolite (stratifié) et thrombolite (coagulé), dendrolite (dendritrique) (Riding, 2011) (**Figure 27**). Les stromatolites sont décrites comme des structures

dominant le registre fossile Précambrien et sont parmi les plus anciennes traces potentielles de vie sur Terre (Couradeau et al., 2013a). C'est pourquoi de nombreuses études ont été réalisées sur des microbialites modernes afin de mieux comprendre les processus biotiques et abiotiques à l'origine de leur formation.

La plupart des microbialites sont précipitées à l'aide de tapis microbiens photosynthétiques composées principalement de cyanobactéries (Popall et al., 2020; Spadafora et al., 2010). Cet écosystème microbien basé sur l'activité photosynthétique induit la formation de ces carbonates, capturant ainsi le carbone inorganique et l'immobilisant sous forme de matière organique et de précipités minéraux. C'est plus précisément l'interaction des communautés microbiennes métaboliquement actives avec leur environnement physico-chimique qui va provoquer la précipitation de ces roches sédimentaires benthiques. L'activité photosynthétique va augmenter localement la concentration de CO_3^{2-} qui est fixé par la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygénase (RuBisCO). L'anion carbonate CO_3^- du milieu intracellulaire est ensuite exporté vers le milieu extracellulaire, par des mécanismes pas encore totalement bien décrits (Obst et al., 2009). Ce processus d'exportation augmente donc l'indice de saturation du microenvironnement, ce qui entraîne une précipitation minérale si des cations libres (par exemple, Ca^{2+}) et des sites de nucléation sont disponibles (Couradeau et al., 2012).

Une étude récente des microbialites modernes a pu établir une meilleure évaluation des conditions nécessaires à leur formation. Il semblerait que leur formation soit induite par de fortes saturations (sursaturations) du milieu en vatérite ou du carbonate de calcium amorphe (ACC) ou du monohydrocalcite (MHC) (Caumartin et al., 2023). Les auteurs (Caumartin et al., 2023) proposent un modèle général pour toutes les microbialites. Considérant une saturation de MHC dans les environnements, cette phase est possiblement précurseur des carbonates anhydres. Ils proposent également l'ACC comme précurseur alternatif dans de nombreux lacs contenant des microbialites. Dans l'ordre chronologique de genèse, l'ACC précipiterait en premier, avant de se transformer en MHC moins soluble, puis en phase de carbonate anhydre (i.e. vaterite). Ainsi la saturation en ACC/MHC ou en vatérite apparaît comme une condition nécessaire à la formation des microbialites modernes.

Bien qu'ils ne soient pas encore totalement décrits, il existe des paramètres biotiques et abiotiques pouvant favoriser ou non la formation des microbialites. En effet, il a été reporté que la taille des microbialites et la structure des communautés microbiennes sont des caractéristiques corrélées avec l'alcalinité de l'environnement. Bien que la diversité taxonomique varie d'une microbialite à l'autre, la diversité fonctionnelle semble assez conservée. Les microbialites sont donc associées à des communautés photosynthétiques oxygéniques et anoxygéniques et à des communautés sulfato-réductrices (considérées comme des carbonatogènes putatifs) (Iniesto et al., 2021).

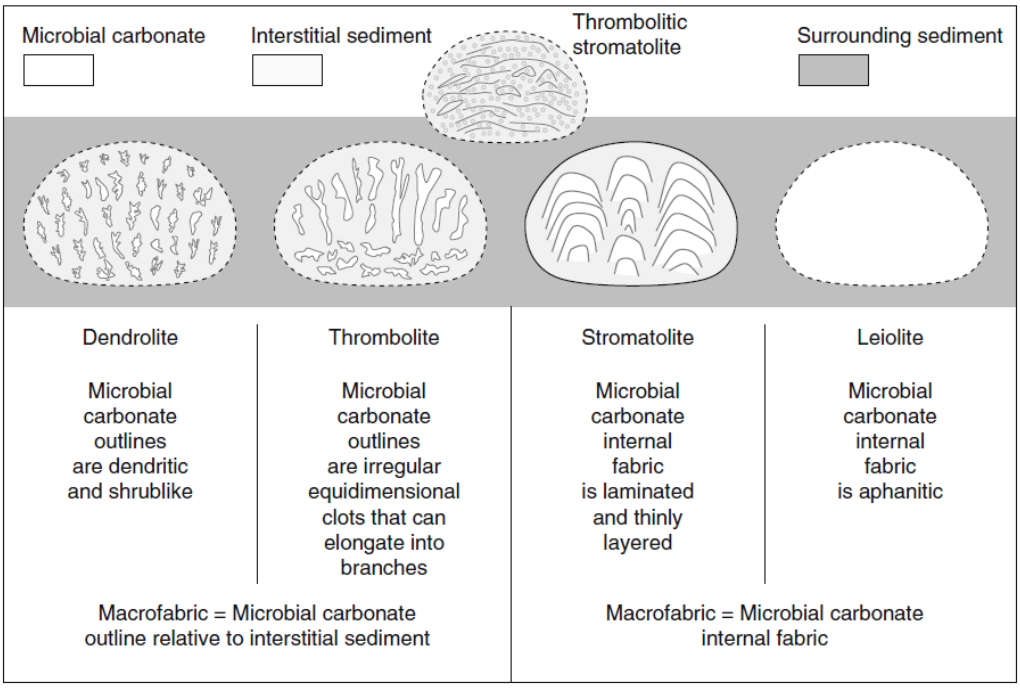


Figure 27 : Carbonates microbiens définis par leur macrofabrication : léiolite (aphanitique), stromatolite (stratifié), thrombolite (coagulé), dendrolite (dendritrique). Les exemples montrent des dômes et les sédiments associés. Riding, 2011.

3.2. Diversité des bactéries formant des carbonates intracellulaires

Si les formes cristallines de carbonate sont répandues dans le vivant, notamment chez les organismes supérieurs et les micro-algues, elles sont dans le domaine des procaryotes, uniquement retrouvées de manière extracellulaire dans les microbialites formés par certains groupes de *Cyanobacteria*. D'autre part, il est discutable de parler de la formation des polymorphes de carbonates de calcium dans ce cas, car les *Cyanobacteria* produisent des iACC minéralisés à cause de l'environnement local sursaturé en calcite hydraté (monohydroxycalcite). On retrouve également des carbonates intracellulaires chez plusieurs espèces, mais uniquement à l'état amorphe sans structure ordonnée et répétitive. A ce jour, trois grands groupes de bactéries se sont révélés capables de biominéraliser des iACC : (1) les bactéries du genre *Achromatium* chez les *Gammaproteobacteria*, une classe des *Pseudomonadota*, (2) plusieurs groupes de cyanobactéries appartenant à l'ordre des *Gloeomargaritales* (e.g. *Candidatus* Gloeomargarita lithophora), et appartenant aux genres *Cyanothece-Synechococcus-*

Neosynechococcus-Thermosynechococcus et (3), des genres de bactéries magnétotactiques non décrits au sein de la classe des *Alphaproteobacteria* (**Figure 28**).

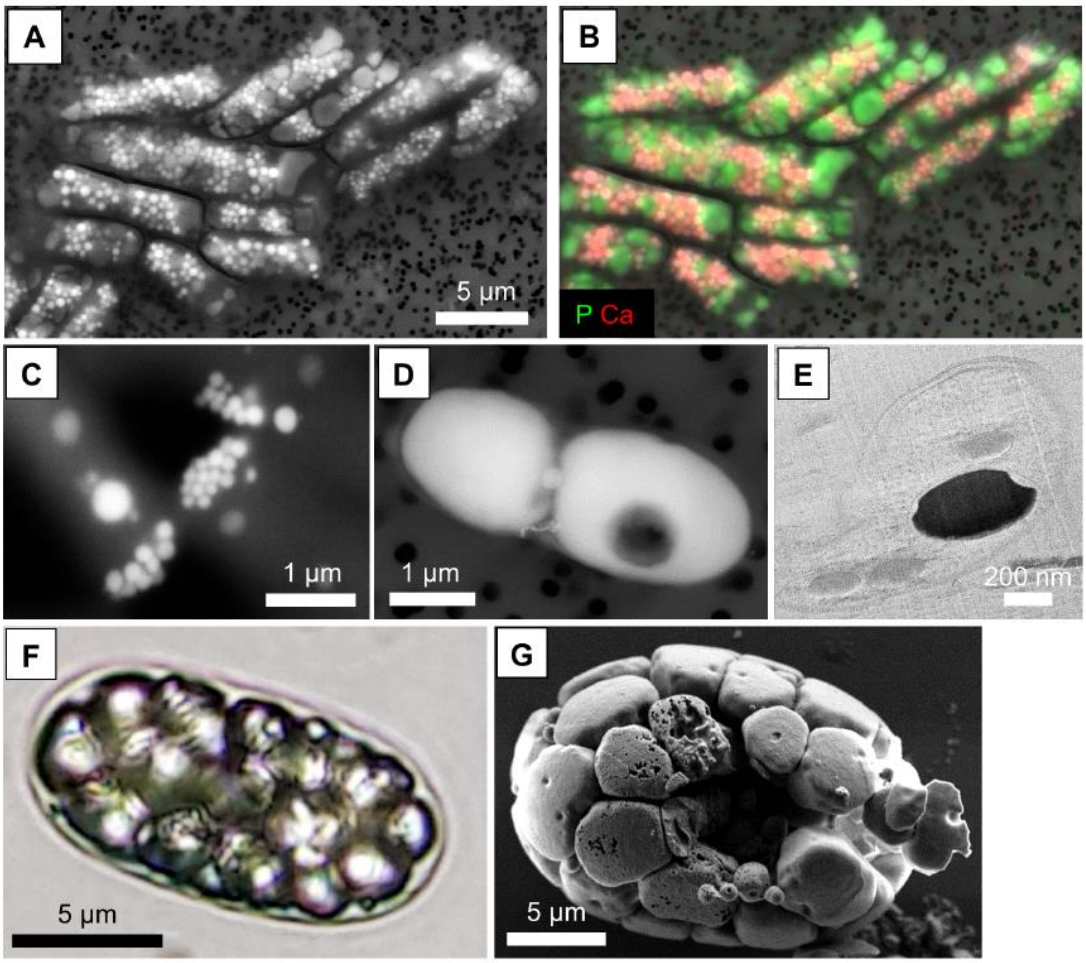


Figure 28 : Diversité des bactéries capables de biominéraliser des inclusions intracellulaires d'ACC. (A) Image de MEB de la cyanobactérie *Neosynechococcus sphagnicola* formant de nombreuses inclusions de ACC (apparaissant blanches) ainsi que des granules de polyphosphate (apparaissant gris). (B) Superposition de cartes chimiques du Ca (en rouge) et du P (en vert) obtenues par spectrométrie des rayons X à dispersion d'énergie sur l'image MEB présentée en (A). (C) Image de MEB de la cyanobactérie *Synechococcus sp*. PCC 6717 formant des ACC intracellulaires situés principalement aux pôles des cellules. (D) Image de MEB d'une alphaprotéobactérie magnétotactique formant deux inclusions d'ACC intracellulaires. Les nanoparticules apparaissant dans la partie inférieure de la cellule correspondent à une chaîne de magnétite. (E) Image de microscopie électronique à cryotransmission d'une section de cryo-ultramicrotomie d'une cellule magnétotactique formant un ACC intracellulaire. Le granule ACC apparaît en noir et semble être entouré par une bicouche lipidique. (F) Image de microscopie optique d'une cellule d'*Achromatium oxaliferum*. Les incliusions correspondent aux ACC. (G) Image de MEB d'une cellule d'*Achromatium* montrant les nombreux granules d'ACC occupant la quasi-totalité du volume de la cellule. Cosmidis et Benzerara (2022).

3.2.1. Biominéralisation de larges inclusions d'ACC par *Achromatium* spp.

Achromatium oxaliferum a été décrite pour la première fois par Schewiakoff (1893) (Schewiakoff W, 1893). Depuis sa découverte, de nombreuses recherches témoignent que le genre *Achromatium* regroupe une diversité d'espèces bactériennes capables d'oxyder le soufre et formant des granules intracellulaires de S^0 élémentaire et de $CaCO_3$ (Gray and Head, 2014). Ces bactéries ubiquitaires sont distribuées dans de nombreux environnements aquatiques stratifiés (d'eau douce, saumâtres et marins) et sont connues

pour se confiner dans des niches microaérophiles, à la limite de l'interface eau-sédiments (Ionescu et al., 2020; Mansor et al., 2015; Salman et al., 2015).

Les différentes souches d'*Achromatium spp.* ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de ces inclusions biominéralisées de $CaCO_3$ pouvant représenter jusqu'à 90 % du volume microbien total (Benzerara et al., 2021) (**Figure 28F, 28G**). Néanmoins, à ce jour, aucune espèce du genre *Achromatium* n'a pu être cultivée. C'est pourquoi de plus en plus d'approches indépendantes de la culture (e.g. analyses à l'échelle de la cellule unique) ont été développées et utilisées pour étudier leurs caractéristiques physiologiques et leurs niches écologiques (Ionescu et al., 2017; Mansor et al., 2015). L'ensemble de ces études témoigne que les populations d'*Achromatium spp*. vivent principalement dans des zones contenant des composés sulfatés réduits. En effet, il semblerait qu'elles oxydent le sulfure en soufre élémentaire en utilisant de l'O_2 ou éventuellement des nitrates en autotrophie (Salman et al., 2015). En raison de la formation de grandes quantités de Ca intracellulaire, les cellules d'*Achromatium* ont un rôle important dans les cycles géochimiques du Ca dans leur habitat.

Toutes les espèces du genre *Achromatium* ont été observées avec des carbonates de calcium intracellulaires, laissant penser pendant longtemps que ce processus de biominéralisation était spécifique à ce taxon bactérien. Toutefois, de nombreuses ambiguïtés ont persisté dans le temps quant à la nature et à la composition de leurs carbonates de calcium intracellulaires. Au départ, on pensait que les granules de carbonate intracellulaire étaient composés d'oxalate de calcium cristallin. Les études postérieures ont conclu qu'il s'agissait plutôt de carbonate de calcium, sous forme de calcite (West and Griffiths, 1913; Babenzien, 1991). Certains auteurs avaient également abordé la possibilité d'une phase amorphe dans certaines conditions. Une étude récente a permis de clarifier cette ambiguïté avec l'utilisation de spectroscopie Raman et a montré que les inclusions de ces bactéries étaient formées de carbonate de calcium amorphe intracellulaire (iACC) (Benzerara et al., 2021). Cette découverte explique les nombreuses interprétations antérieures faites par spectroscopie Raman. En effet, une forte intensité du faisceau d'irradiation, durant l'analyse spectroscopique, provoque une cristallisation immédiate du biominéral initialement amorphe.

3.2.2. Biominéralisation d'iACC par les cyanobactéries

Le deuxième groupe formant des iACC est représenté par de nombreuses espèces de cyanobactéries (Benzerara et al., 2014; Couradeau et al., 2012). Les cyanobactéries constituent un groupe phylogénétiquement diversifié de bactéries capables d'effectuer la photosynthèse oxygénique (Herrero and Flores, 2008) et occupent un large éventail d'habitats terrestres, marins et d'eau douce (Couradeau et al., 2012). Elles constituent d'importants producteurs primaires modernes, comme en témoignent les deux genres de cyanobactéries marines *Prochloroccocus* et *Synechoccocus*, qui sont responsables de 25 % de la photosynthèse mondiale (Jansson and Northen, 2010). Les cyanobactéries

calcifiantes semblent très courantes depuis l'apparition de stromatolithes fossiles, supportant qu'il s'agit d'un groupe microbien qui a émergé très tôt (Couradeau et al., 2012). Ainsi, les cyanobactéries jouent un rôle majeur dans le cycle du carbone en convertissant le CO_2 en carbone organique et en carbonate (Jansson and Northen, 2010). Comme mentionné dans les sections précédentes, l'exemple des microbialites témoigne que la précipitation de carbonate par certaines cyanobactéries résulte de leur activité photosynthétique (Arp et al., 2001).

Dans le cadre de ses recherches, Couradeau *et al.* ont découvert en 2012 un cas de biominéralisation intracellulaire contrôlée chez une cyanobactérie de l'ordre des *Gloeobacterales* (Couradeau et al., 2012). Comme pour les espèces d'*Achromatium*, il a été démontré par la suite que plusieurs groupes de cyanobactéries des genres *Cyanothece*, *Synechococcus* (**Figure 28C**), *Neosynechococcus* (**Figure 28A, 28B**), *Thermosynechococcus* étaient capables de former des carbonates de calcium amorphes intracellulaires (iACC) même lorsque le milieu extracellulaire est sous-saturé en phases carbonatées. Cette observation est une preuve d'une formation active de ces iACC, contrôlée par la cellule et indique l'existence d'un coût énergétique cellulaire pour le transport et l'absorption du calcium (Cam et al., 2016). De plus, la composition chimique de ces inclusions intracellulaires est très diverse chez certaines espèces. Par exemple, il a été montré que dans des conditions de culture, *Gloeomargarita lithophora* était capable de biominéraliser des carbonates de Ca-Mg-Sr-Ba amorphes intracellulaires (Blondeau et al., 2018b; Couradeau et al., 2012). D'autres études sur *G. lithophora* ont prouvé sa capacité à accumuler du Sr et du Ba, ce qui est intéressant pour des applications de bioremédiation (Blondeau et al., 2018a; Cam et al., 2016). Il a été démontré qu'une souche absorbe préférentiellement les AEM les plus lourds (Ba > Sr > Ca > Mg), suggérant une sélectivité spécifique, contrôlée génétiquement, de l'absorption des AEM (**Figure 29**).

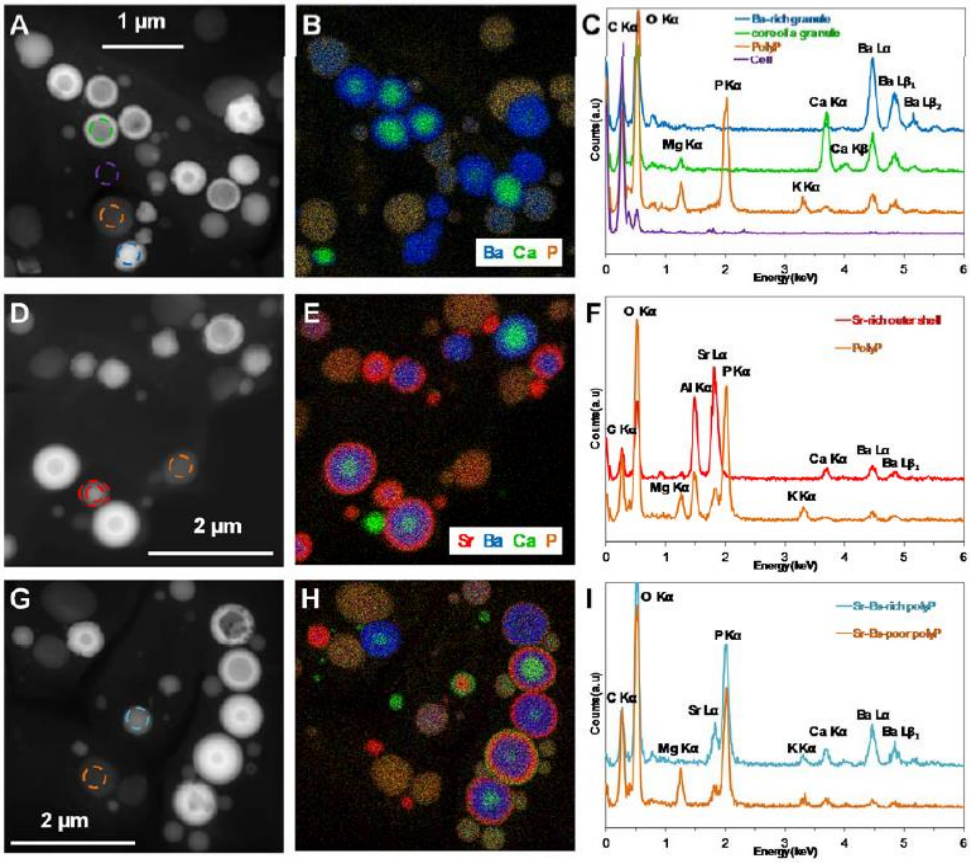


Figure 29 : Incorporation des métaux alcalino-terreux (AEM) dans les inclusions d'ACC de la cyanobactérie *Gloeomargarita lithophora.* Analyses STEM et EDXS de cellules de *Gloeomargarita lithophora* collectées après 75 h de culture pendant l'étape d'absorption de Ba (A, B et C), pendant l'étape d'absorption de Sr (D, E et F) et pendant l'étape d'absorption du Ca (G, H et I). Cam *et al.* (2016)

3.2.3. Biominéralisation d'iACC par un groupe de bactéries magnétotactiques

Le troisième groupe de bactéries productrices d'iACC a récemment été découvert dans les sédiments et la colonne d'eau du lac Pavin (Auvergne, France). Différentes espèces voire genres de bactéries magnétotactiques produisant des iACC, affiliées à la classe des *Alphaproteobacteria*, ont été caractérisées (Monteil et al., 2021). Ces MTB productrices d'iACC ont le même morphotype, celui-ci a été nommée CCP1 (Monteil et al., 2021) (*Calcium Carbonate Producing* #1). Ce morphotype consiste en une bactérie en forme de bâtonnet produisant entre 2 et 4 inclusions d'ACC (~856 nm de largeur) occupant la grande majorité de l'espace intracellulaire (i.e. 73 % de l'aire cellulaire, et 65 % du volume total cellulaire) (Monteil et al., 2021). Des coupes transversales ont permis d'observer une membrane autour de ces inclusions suggérant l'existence d'organites spécialisés avec un lumen isolé de l'espace cytoplasmique. Ces inclusions d'ACC représentent un volume significativement important, de manière similaire à *Achromatium* (jusqu'à 90%) (Benzerara et al., 2021). Ces MTB présentent donc une double biominéralisation intracellulaire avec la formation d'iACC et de magnétosomes. Néanmoins, il se pourrait qu'il existe d'autres espèces de bactéries magnétotactiques capables de biominéraliser des carbonates. En effet, une étude en 2014 a identifié et caractérisé une

Gammaproteobacteria géante (~13×~8 µm) magnétotactique incultivable (GRS-1) formant de larges inclusions (2.5 à 4.5 µm) enrichies en calcium (Taoka et al., 2014) (**Figure 25B**). Cette étude s'est arrêtée à la détection de l'élément chimique majoritaire à l'échelle des inclusions, qui était le calcium sans chercher à confirmer si cela était associé à des polyphosphates ou à un autre minéral. Cependant la densité des structures sur les images de microscopie électronique pourrait être cohérentes avec celles de carbonates comme décrit dans Monteil *et al.* (2021), en supposant que les inclusions de GRS-1 soient des phases de carbonate amorphe. Récemment, un autre genre de MTB (souche **XQGS-1**) appartenant aux *Alphaproteobacteria* a été découvert, formant des petites inclusions de **phosphate de calcium amorphe** (2 à 3 granules par cellules mesurant 90.5 nm de largeur) et des **nano-cristaux de carbonate de calcium** (2 à 3 granules par cellules mesurant 100.4 nm de largeur) (**Figure 30**) (Liu et al., 2021). Toutes ces observations suggèrent que la diversité phylogénétique des MTB productrices d'iACC est sous-estimée.

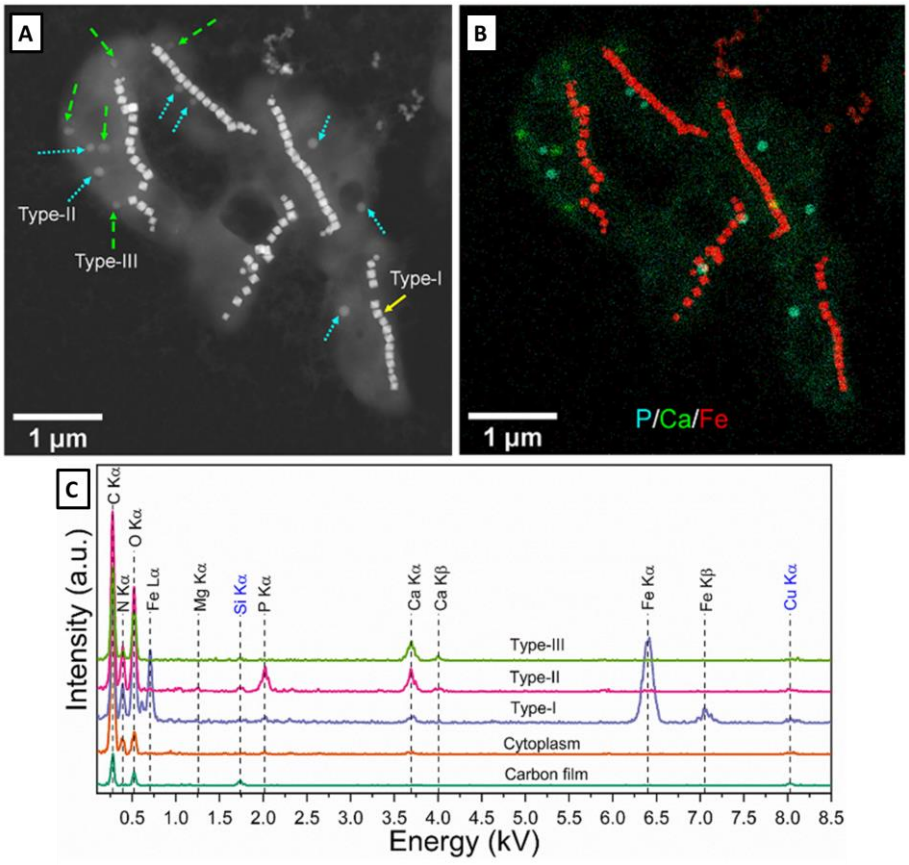


Figure 30 : Biominéralisation de carbonate de calcium intracellulaire, de phosphate de calcium amorphe, et de magnétite par une souche de MTB (XQGS-1) affiliée aux *Alphaproteobacteria*. A) Image de STEM-HAADF. Les flèches jaunes pleines, cyan en pointillés et vertes en pointillées indiquent les inclusions de type I, II et III, respectivement. B) Cartographie élémentaire EDXS de cinq cellules XQGS-1 détectant les éléments phosphore (cyan), calcium (vert) et fer (rouge). C) Spectres XEDS pour des régions sélectionnées du film de carbone sur la grille MET et du cytoplasme des cellules XQGS-1, avec des inclusions de type I (particules de magnétite), des inclusions de type II (granules de phosphate de calcium) et des inclusions de type III (inclusions de carbonate de calcium). Liu *et al.* (2021)

3.3. Hypothèses sur le rôle biologique des phases carbonatées intracellulaires

Si les mécanismes génétiques sous-jacents à la formation et le rôle des magnétosomes sont plutôt bien connus, ce n'est pas le cas des iACC dans tous les groupes d'$_{iACC}$B, certaines hypothèses ont toutefois été soulevées. De manière générale, les inclusions cellulaires sont des organites (ou microcompartiments) largement présents dans les microorganismes et décrits comme ayant plusieurs rôles fonctionnels propres à la cellule : énergie, stockage de nutriments, détoxification, motilité ou métabolisme (Li et al., 2021). Dans le cas des iACC, ils pourraient être utilisés comme (i) une source d'accepteurs d'électrons dans la « respiration carbonatée » (Görgen et al., 2020), (ii) un mécanisme de régulation de la flottabilité (Couradeau et al., 2012; Gray, 2006; Gray et al., 2004), (iii) un système tampon, équilibrant le pH intracellulaire à la suite de la dissolution des minéraux soufrés (Gray, 2006) ou encore (iv) un mécanisme efficace de concentration du carbone (Li et al., 2016) (**Figure 31**). Dans tous les cas, les voies métaboliques et les déterminants génétiques impliqués dans la formation du carbonate de calcium sont encore mal décrits (Benzerara et al., 2021; Monteil et al., 2021).

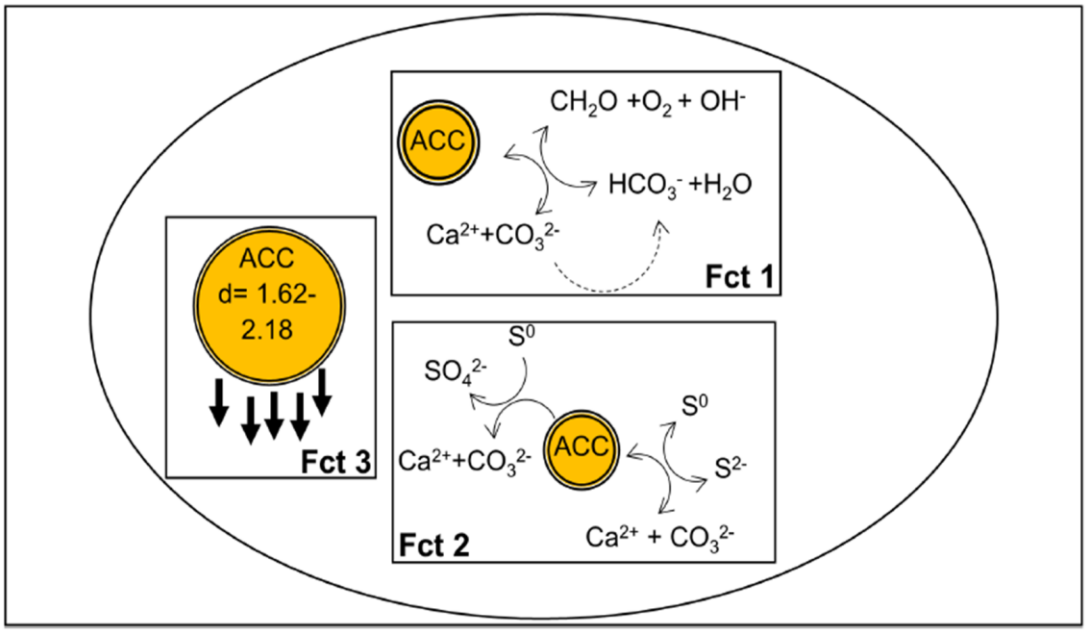


Figure 31 : Diversité des fonctions biologiques des phases intracellulaires de carbonate de calcium amorphe (iACC) chez les bactéries. Une première fonction (Fct 1) est liée à l'homéostasie du pH intracellulaire lors de la fixation du carbone (par exemple, la photosynthèse oxygénique et/ou l'utilisation du C inorganique stocké dans l'ACC pour la fixation du C). Une deuxième fonction (Fct 2) est liée à l'homéostasie du pH intracellulaire lors de l'oxydation du soufre (par exemple, chez *Achromatium* et/ou chez les alphaprotéobactéries magnétotactiques). L'oxydation du soufre élémentaire en sulfates ou la réduction du soufre élémentaire en sulfure sont associées à la dissolution de l'ACC. Enfin, une troisième fonction (Fct 3) est liée à la modification de la flottabilité des cellules, permise par la densité relativement élevée des iACC par rapport à celle de l'eau. Cosmidis & Benzerara, 2022.

3.4. Mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans la formation des phases carbonatées

Les trois organismes présentés précédemment ont tous les points communs suivants : (i) la minéralisation des ACC est intracellulaire et (ii), elle peut se produire dans des conditions environnantes sous-saturées en $CaCO_3$. Cette biominéralisation est donc énergétiquement coûteuse. Pour permettre de former ces organites, il faut à minima des transporteurs associés à l'incorporation des carbonates et des AEM dans leur lumen, plus éventuellement des protéines permettant la création de la membrane protéique ou lipidique dans le cas des *Pseudomonadota*. En effet, la nature de l'enveloppe délimitant ces compartiments peut être de nature différente en fonction des phylums : une enveloppe composée d'une enveloppe protéique ou d'une monocouche protéique chez les *Cyanobacteria* (Blondeau et al., 2018b) et d'une bicouche lipidique chez les *Pseudomonadota* (Gray, 2006; Monteil et al., 2021). Cela suggère qu'au moins une partie du processus de biominéralisation intracellulaire de ACC peut avoir évolué de manière convergente dans différents groupes bactériens en impliquant différents mécanismes (Cosmidis and Benzerara, 2022). Il faut également un métabolisme permettant de produire ou séquestrer ces carbonates à partir d'un substrat carboné organique ou inorganique. Lorsqu'ils sont inconnus, la recherche de tels acteurs nécessite à la fois des données génomiques, de transcriptomique comparée, de génétique moléculaire et *in concreto* d'un organisme en culture pour développer toutes ces approches. Le manque de cultures disponibles et le séquençage des génomes n'étant devenu une méthode de routine que depuis peu de temps, l'étude des mécanismes de formation des iACC n'a été possible que depuis quelques années avec la découverte des cyanobactéries produisant des iACC. Dans cette section, sont à la fois présentées les voies métaboliques utilisées par les bactéries et possiblement liées à l'incorporation du carbone et les autres déterminants génétiques impliqués dans la carbonatogenèse intracellulaire.

En dehors de ces faits, les mécanismes moléculaires de la formation d'ACC intracellulaire chez l'ensemble des *Pseudomonadota* restent actuellement inconnus. Plusieurs de ces bactéries contiennent un gène codant pour la RuBisCO et peuvent fixer le C inorganique. En effet, la **fixation du CO_2** peut favoriser la précipitation des carbonates. Cependant, cela peut ne pas être une exigence puisque certaines populations d'*Achromatium* ne contiennent aucun de ces gènes, tout en étant capables de biominéraliser des iACC (Gray, 2006). De plus, les **transporteurs de calcium** ont été ciblés dans les génomes des bactéries formant des iACC en tant qu'acteurs importants possibles, mais aucune spécificité n'a été particulièrement mise en évidence par rapport aux bactéries ne biominéralisant pas d'iACC (De Wever et al., 2019). Une étude récente a identifié un gène (*ccyA*) codant pour une nouvelle famille de protéines (calcyanine) associés à la biominéralisation des iACC cyanobactérien (Benzerara et al., 2022). A ce jour,

on ne sait pas si ce marqueur est présent chez les *Pseudomonadota* suggérant un éventuel HGT ou une convergence évolutive à l'origine de la biominéralisation d'iACC.

3.5. Les voies métaboliques possibles d'incorporation du carbone dans les carbonates chez les $_{iACC}$B

3.5.1. Généralités sur les métabolismes bactériens

Le métabolisme est l'ensemble des transformations chimiques et des transferts d'énergie qui se déroulent de manière ininterrompue chez un être vivant. Le catabolisme (ou voie bioénergétique) est l'ensemble des réactions métaboliques impliquées dans la production d'énergie par la dégradation de composés organiques, tandis que l'anabolisme (ou voie de biosynthèse) est l'ensemble des réactions métaboliques impliquées dans la synthèse des constituants cellulaires. On peut définir des types trophiques en fonction des sources d'énergie, de carbone et les accepteurs terminaux d'électrons. Il existe trois grands processus pour produire de l'énergie : la respiration cellulaire, la fermentation et la photosynthèse.

La **respiration cellulaire** est le processus par lequel les cellules convertissent les molécules (e.g. sucres, acides gras) en énergie. Pour créer de l'ATP et d'autres formes d'énergie afin d'alimenter les réactions cellulaires, les cellules ont besoin d'un combustible et d'un accepteur terminal d'électrons, ce qui déclenche le processus chimique de transformation de l'énergie en une forme utilisable. . La respiration peut avoir lieu en condition aérobie ou anaérobie. Alors que la première utilise l'O_2 comme seul accepteur terminal d'électrons, la seconde est réalisée par des microorganismes qui peuvent utiliser divers accepteurs terminaux d'électrons comme par exemple lors de la sulfato-réduction (SO_4^{2-}), la dénitrification (NO_3^{2-}), ou encore la ferri-réduction (Fe^{3+}).

La **fermentation** microbienne est un processus par lequel un substrat organique est métabolisé sans avoir besoin d'un accepteur terminal d'électrons externe. La fermentation peut se faire à partir d'une molécule qui peut aussi bien servir alternativement de donneur et d'accepteur terminal d'électrons, contrairement à la respiration où l'accepteur terminal et le donneur sont obligatoirement différents. Pendant la fermentation, l'ATP est générée par la phosphorylation au niveau du substrat, puis hydrolysée par la FOF1-ATPase couplée à un gradient électrochimique. Outre la FOF1-ATPase, des produits finaux de la fermentation tels que des acides organiques faibles comme le lactate ou le succinate peuvent être générés. La fermentation n'est généralement pas le mode de croissance préféré des micro-organismes car elle ne génère que de faibles quantités d'ATP. Cependant, cela est souvent déterminé par l'habitat dans lequel se trouvent les micro-organismes.

La **photosynthèse** est le processus bioénergétique qui permet à des organismes de synthétiser de la matière organique en utilisant l'énergie lumineuse, l'eau et le dioxyde de carbone.

Le bon fonctionnement et la physiologie d'une cellule repose principalement sur la notion d'énergie (e.g. conservation et utilisation). L'ensemble des processus métaboliques au sein d'une bactérie exige donc plusieurs éléments pour atteindre son équilibre bioénergétique : une source d'énergie (chimique ou lumineuse), une source de carbone (organique ou inorganique), une source d'électrons (organique ou inorganique), des facteurs de croissance (e.g. vitamines), et des éléments traces (e.g. zinc, cobalt, cuivre). Tous les organismes doivent conserver l'énergie en convertissant l'énergie chimique ou lumineuse en ATP. Ils ont également besoin d'une source d'électrons très électronégatifs (source de pouvoir réducteur) pour effectuer des réactions d'oxydoréduction. Enfin, ils doivent atteindre l'équilibre redox soit en (i) régénérant des transporteurs d'électrons oxydés ou soit (ii) en recyclant les électrons sur un intermédiaire métabolique (Madigan, M. T et al., 2022).

Toutes les cellules peuvent ainsi conserver de l'énergie, obtenir un pouvoir réducteur et atteindre l'équilibre redox en effectuant des réactions d'oxydo-réduction. Les voies métaboliques sont très modulables et bien souvent réversibles, favorisant une certaine diversité métabolique qui a pu évoluer et continue d'évoluer par transfert horizontal de gènes. Par exemple, les mécanismes de transport d'électrons (accepteurs, donneurs) sont très diversifiés dans la respiration cellulaire (**Figure 32**). La tendance d'une substance à donner ou accepter des électrons est définie par son potentiel de réduction (E'_0 exprimé en Volts). Une grande diversité de donneurs et d'accepteurs d'électrons organiques et inorganiques existe. Ainsi, selon la source d'énergie préférentielle, la source de carbone biodisponible, et la source de pouvoir réducteur (électrons), des termes sont ainsi donnés pour définir le type trophique de chaque organisme vivant (**Tableau 2**).

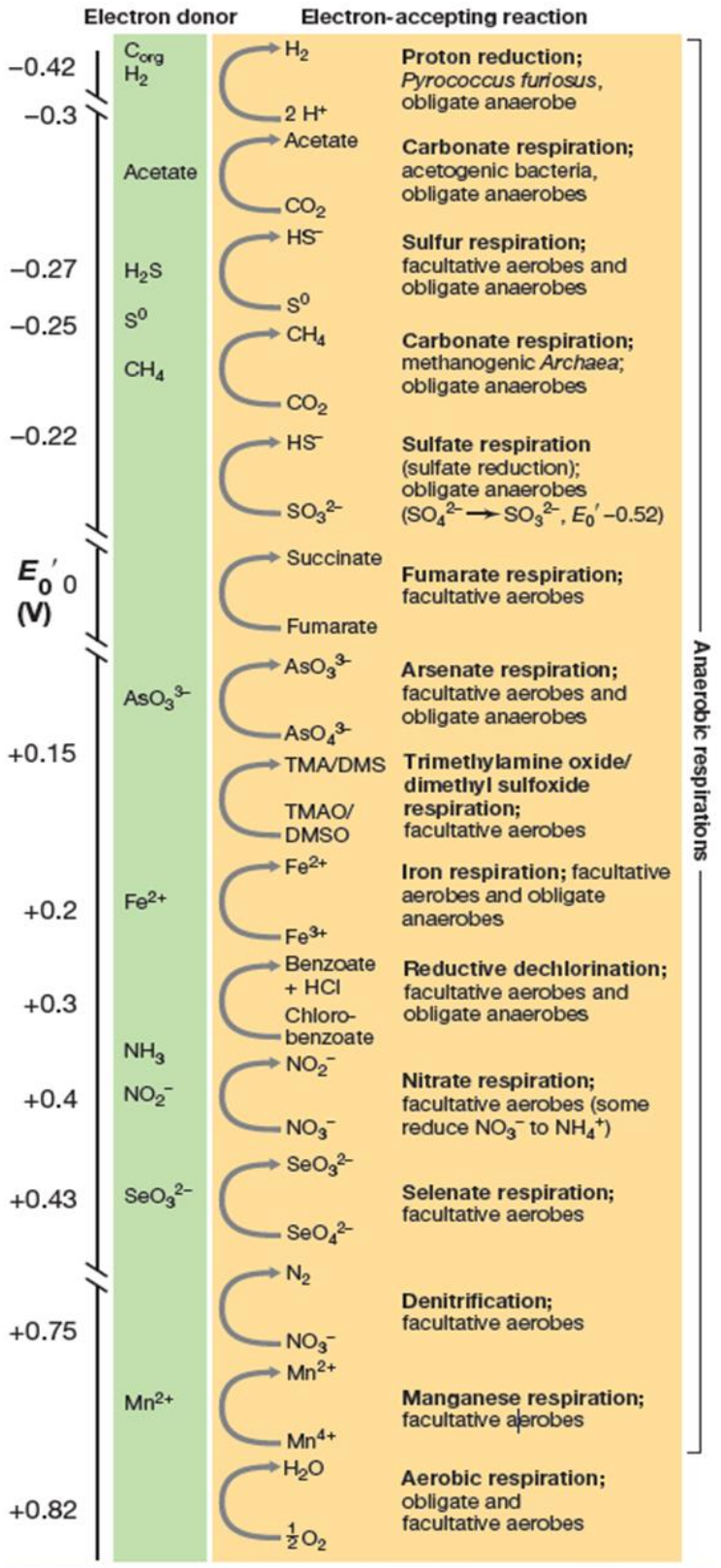


Figure 32 : Diversité métabolique des réactions d'oxydation-réduction intervenant dans la respiration cellulaire (Madigan, M. T et al., 2022)

Tableau 2 : Types trophiques les plus retrouvés chez les microorganismes. Inspiré de Prescott, Harley, and Klein's Microbiology 7th edition. Chaque microorganisme a besoin d'une source d'énergie lumineuse (vert) ou organique (bleu), d'une source d'électrons inorganique (marron) ou organique (marron clair), et d'une source de carbone inorganique (rouge) ou organique (orange).

Source d'énergie	Source d'électrons	Source de carbone
Lumière (photo-)	Inorganique (litho-)	Inorganique (auto-)
Organique (chimio-)	Organique (organo-)	Organique (hétéro-)

Type trophique	Source d'énergie	Source d'électrons	Source de carbone	Métabolisme
Photo-litho-autotrophe	Lumière	Inorganique	Inorganique (e.g. CO_2)	Bactéries pourpres et vertes sulfureuses, cyanobactéries
Photo-organo-hétérotrophe	Lumière	Organique	Organique (e.g. acétate)	Bactéries pourpres et vertes non sulfureuses
Chimio-litho-autotrophe	Molécule inorganique	Inorganique	Inorganique	Bactéries nitrifiantes, bactéries sulfo-oxydantes, méthanogènes, bactéries fero-oxydantes
Chimio-litho-hétérotrophe	Molécule inorganique	Inorganique	Organique et le CO_2 peut aussi	Quelques bactéries sulfo-oxydantes (e.g. *Beggiatoa*)
Chimio-organo-hétérotrophe	Molécule organique souvent identique à la source de carbone (e.g glucose)	Organique	Organique	Microorganismes non photosynthétiques (e.g. fungi, protistes, archées)

3.5.2. Les voies de fixation du carbone inorganique

Le carbone est un élément essentiel à toute forme de vie. On retrouve deux types de carbone dans la nature : le **carbone organique** (fabriqué par le vivant : lipides, protéines, glucides) par opposition au **carbone inorganique** ou **minéral** (ne comportant pas de liaison carbone-carbone ou carbone-hydrogène). Ainsi, la chimie du carbone et de l'oxygène est au centre des voies métaboliques et par conséquent, du vivant. Les actions des micro-organismes vont permettre d'extraire le carbone de sources non vivantes et de le rendre disponible pour les organismes vivants (y compris eux-mêmes), ce sont des producteurs primaires, à la base de tous les réseaux trophiques. Une grande partie du carbone qui entre dans le cycle du carbone est du dioxyde de carbone (CO_2). Cette forme de carbone existe sous forme de gaz dans l'atmosphère, mais avant de pouvoir être incorporée aux organismes vivants, elle doit être transformée en une forme organique utilisable. Le processus de transformation par lequel le CO_2 est prélevé dans le réservoir atmosphérique et "fixé" dans des substances organiques est appelé **fixation du carbone** (Abatenh et al., 2018). Ce processus dépend donc de la biodisponibilité des éléments chimiques et du cycle du carbone et de l'oxygène. Par exemple, les microorganismes photosynthétiques (e.g. cyanobactéries et microalgues) sont capables de fixer et de réduire le CO_2 conduisant à la libération d'O_2 (**Figure 33**).

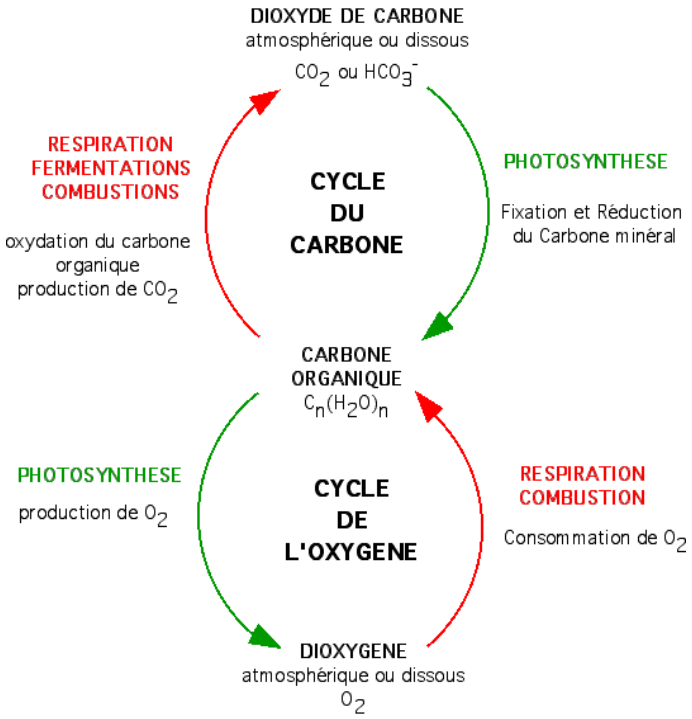


Figure 33 : Généralités sur le cycle du carbone et le cycle de l'oxygène et les métabolismes associés. La photosynthèse des végétaux chlorophylliens est responsable de la fixation et de la réduction de CO_2, ainsi que de la libération d'O_2. À l'inverse, la fonction respiratoire des organes et organismes non chlorophylliens est responsable de l'oxydation des composés organiques (consommation d'O_2, libération de CO_2). Il en résulte un cycle pour le carbone et un cycle pour l'oxygène qui sont antiparallèles. Source de la figure: *planet-vie.ens.fr*

Les carbonates (CO_3^{2-}) sont des ions formés d'un atome de carbone et trois atomes d'oxygène chargés négativement. La formation de carbonates nécessite donc la production ou la fixation de CO_2. Les microorganismes fixateurs de CO_2 sont généralement classés en microorganismes photosynthétiques et non-photosynthétiques (**Figure 34**). Les microorganismes non photosynthétiques capables de fixer le CO_2 sont placés dans le domaine des archées, appartenant aux phylums *Crenarchaeota* et *Euryarchaeota*, et dans le domaine des bactéries, appartenant aux taxons *Aquificae*, *Actinomycetes*, *Chloroflexia*, *Chlorobiota*, *Bacillota* (anciens *Firmicutes*), *Pseudomonadota* (anciens *Proteobacteria*) et *Thermodesulfobacteria* (anciens *Deltaproteobacteria*) (Salehizadeh et al., 2020). Bien que la diversité taxonomique soit bien décrite, il existe moins d'études sur les mécanismes de fixation du CO_2 par ces microorganismes non-photosynthétiques hétérotrophes, par rapport aux microorganismes photosynthétiques (e.g. cyanobactéries, microalgues) (Salehizadeh et al., 2020).

A ce jour, six voies de fixation du CO_2 ont été proposées (Gong et al., 2016; Salehizadeh et al., 2020), notamment :

- Le cycle de **Calvin-Benson-Bassham** (CBB) (cycle de Calvin ou pentose phosphate réducteur) en **aérobie**. Il s'agit de la voie métabolique la plus répandue et

importante dans la fixation du CO_2. Cette voie est utilisée par tous les organismes phototrophes oxygéniques (cyanobactéries, algues, plantes) mais également par des bactéries pourpres, et des bactéries chimiolithotrophes aérobes. Cette voie métabolique est très répandue suggérant qu'il y a eu des HGT permettant d'acquérir les gènes/enzymes clés pour utiliser ce cycle.

- Le cycle de l'**acide tricarboxylique réducteur** (rTCA) ou **cycle de Krebs inverse** en anaérobie. Cette voie permet à certaines bactéries de fixer le CO_2 sous forme d'acétyl-CoA en utilisant l'ion H_2, l'ion sulfure S^{2-} ou encore l'ion thiosulfate $S_2O_3^{2-}$ comme donneurs d'électrons. Le rTCA utilise de nombreuses molécules d'ATP, d'H et CO_2 pour générer un acétyl-CoA. Ce processus nécessite un certain nombre de réactions de réduction utilisant divers composés carbonés avec des enzymes qui lui sont propres. La présence de métaux semblerait favoriser la production de ce cycle inverse (Muchowska et al., 2017).
- Le cycle de **WoodLjungdahl** (W-L) ou voie de ***l'acétyl-CoA réducteur*** en **anaérobie**. Cette voie est utilisée pour la fixation du CO_2, mais aussi pour la production d'énergie par certaines bactéries et archées strictement anaérobes. Le cycle de W-L permet la formation d'acétate CH_3COO^- à partir de H_2 (donneur d'électron) et de CO_2 (accepteur d'électron et source de carbone)(Ragsdale, 2008).
- Le (bi)cycle du **3-hydroxypropionate** (3-HP/malyl-CoA) en **aérobie**. La première étape du cycle permet la fixation du CO_2 aboutissant à la production d'acétyl-CoA et de glyoxylate ($OHC–COO^-$). La deuxième partie implique l'assimilation du glyoxylate aboutissant à la production de pyruvate et de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA formé au cours de la deuxième étape permet de fermer le cycle avec la première étape, tandis que le pyruvate produit est utilisé comme métabolite précurseur pour tous les métabolismes ultérieurs (Tabita, 2009).
- Le cycle du **3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate** (3HP-4-HB) en **aérobie** ou **anaérobie**. L'acétyl-CoA est réduit en succinyl-CoA via le 3-hydroxypropionate. Cet intermédiaire est réduit en 4-hydroxybutyrate et converti en deux molécules d'acétyl-CoA (Berg et al., 2007).
- Le cycle du **dicarboxylate/4-hydroxybutyrate** (DC/4-HB) en **anaérobie**. L'acétyl-CoA est réduit en pyruvate et de nombreuses réactions intermédiaires aboutissent à l'oxydation du crotonyl-CoA formant deux molécules d'acétyl-CoA (Huber et al., 2008).

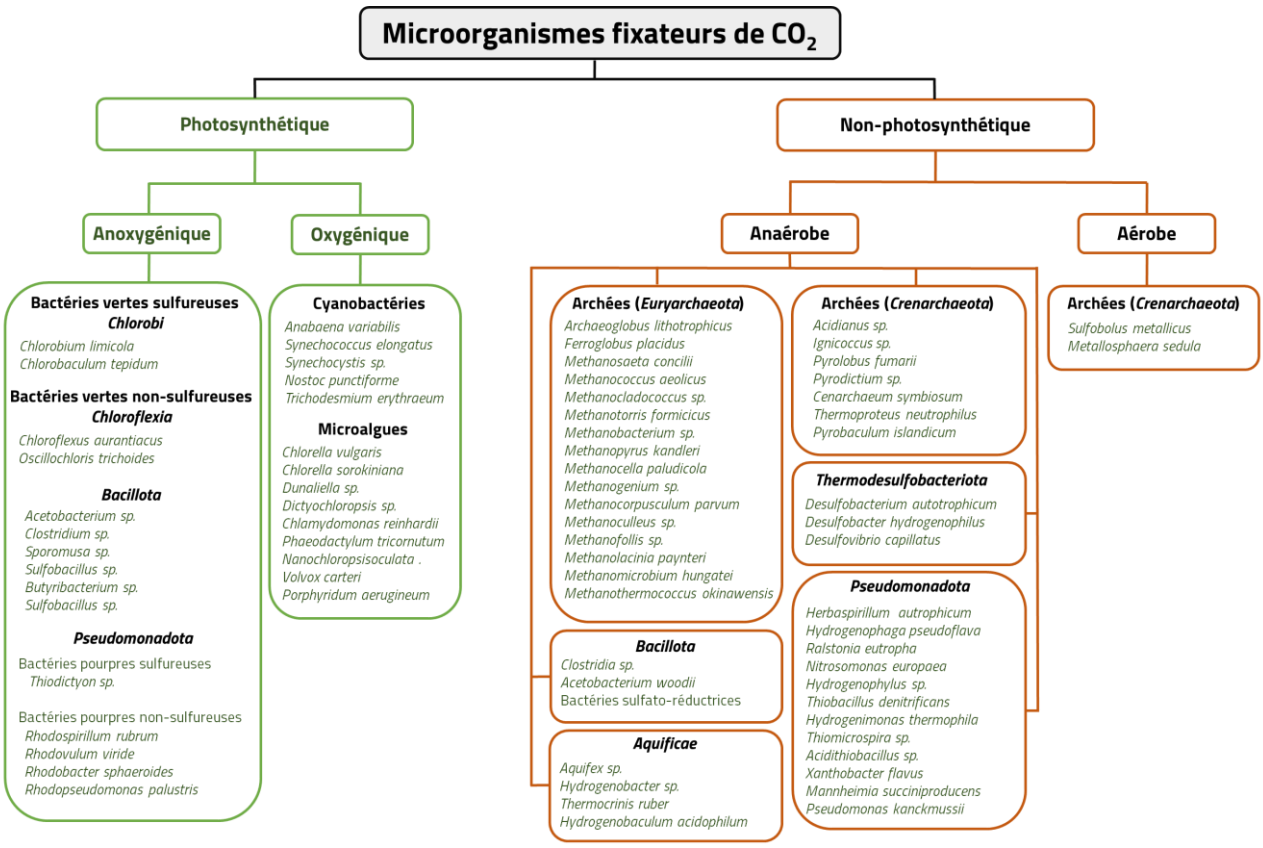


Figure 34 : Diversité des microorganismes fixateurs de CO_2 classée en deux groupes : microorganismes photosynthétiques anoxygéniques et oxygéniques (en vert) et microorganismes non-photosynthétiques anérobes et aérobes (en orange). Inspiré de Salehizadeh *et al.* (2020)

À l'exception des iACCMTB pour lesquelles aucune preuve génomique n'a encore été fournie, la plupart des iACCB décrits contiennent un **gène homologue de la RuBisCO** et peuvent fixer le carbone inorganique (Mansor et al., 2015; Yang et al., 2019) qui est incorporé dans les carbonates intracellulaires. Il n'est donc pas impossible que les populations de iACCMTB possèdent aussi la capacité de fixer le carbone inorganique *via* l'enzyme RuBisCO. Cet enzyme clé permet la réduction du CO_2 en glyceraldehyde 3-phosphate. La RuBisCO est utilisée par certaines bactéries photoautotrophes et/ou chimiolithoautotrophes comme certaines populations d'*Achromatium sp.* et de *Cyanobacteri*a mixotrophes ou photo- ou chimio-lithoautotrophes facultatives.

Aucune voie, autre que le cycle CBB n'a été détectée dans des ébauches de génomes chez *Achromatium* (Mansor et al., 2015). De nombreuses bactéries utilisant la voie CBB possèdent des microcompartiments tels que les carboxysomes, site principal d'activité de la RuBisCO (e.g. cyanobactéries) (**Figure 35**).

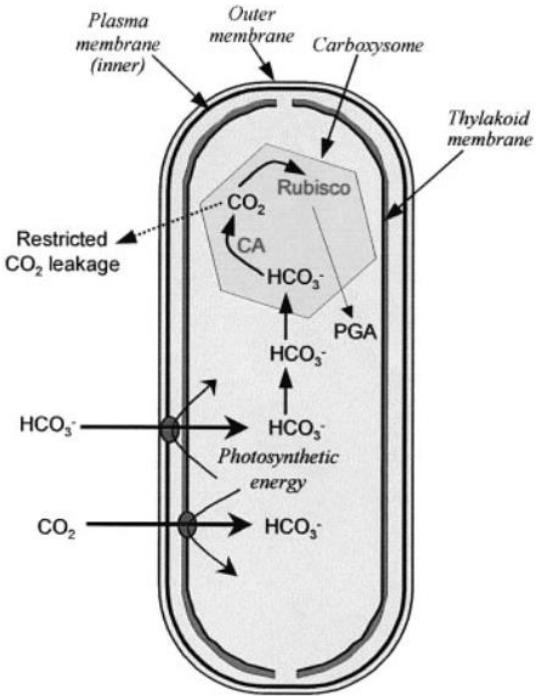


Figure 35 : Mécanismes moléculaires associés à la fixation du CO_2 grâce à la RuBisCO au sein du carboxysome. D'après Badger and Price (2003)

Bien que le CBB soit la voie de fixation du CO_2 la plus répandue, de nombreuses bactéries et archées autotrophes utilisent d'autres voies pour fixer le CO_2. Par exemple, le cycle rTCA est également une voie très répandue pouvant être utilisée par des bactéries sulfureuses vertes (e.g. *Chlorobium*), mais également par des bactéries anaérobes ou des chimiolithotrophes en microaérophilie (**Figure 36**) (Madigan, M. T et al., 2022). Au sein de ce cycle, le CO_2 est réduit par l'inversion des étapes du cycle de l'acide citrique. Chez les MTB, la RuBisCo chez les *Alphaproteobacteria* et les *Gammaproteobacteria* (Bazylinski et al., 2004; Lefèvre et al., 2012), le rTCA chez les *Ca*. Magnetococcia (Williams et al., 2006) et le cycle de W-L chez les *Thermodesulfobacteriota*, ont été identifiés pour la fixation du Ci (Goswami et al., 2022; Lefèvre et al., 2013b). Il est aussi intéressant de noter que la *Gammaproteobacteria* magnétotactique SS-5 a également la capacité de produire des carboxysomes (résultats en cours de publication au laboratoire).

Comme son nom l'indique, la plupart des réactions du cycle rTCA sont catalysées par des réactions inverses des enzymes du cycle de l'acide citrique. Cependant, le cycle nécessite également l'activité de plusieurs enzymes uniques. Il s'agit notamment des enzymes α-kétoglutarate synthase et pyruvate synthase, qui catalysent la fixation réductrice du CO_2 à l'aide d'électrons fournis par le cycle de l'acide citrique (Madigan, M. T et al., 2022) (**Figure 36**).

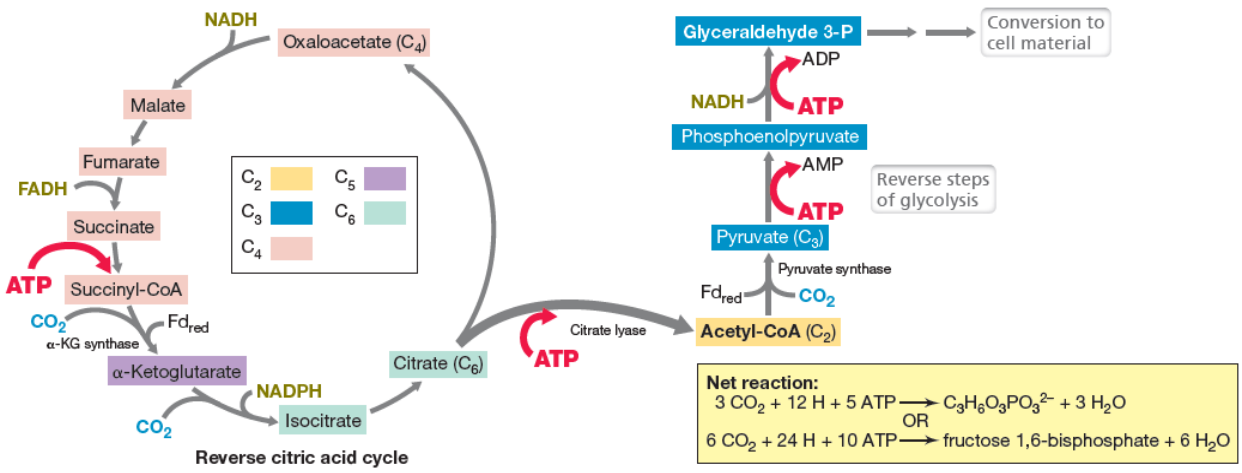


Figure 36 : Fixation du CO_2 grâce au cycle de l'acide tricarboxylique réducteur (rTCA). À partir de l'oxaloacétate, chaque tour du cycle entraîne l'incorporation de trois molécules de CO_2 et la production de pyruvate. Le pyruvate est un métabolite clé qui peut alimenter directement la voie glycolytique, générant des sucres et d'autres intermédiaires biosynthétiques importants. Madigan, M. T *et al.*, 2022.

Bien qu'elles soient connues pour fixer le CO_2, les quatre autres voies (citées précédemment), ne sont pas autant détaillées que les voies de CBB et rTCA. Certaines bactéries autotrophes utilisant des donneurs d'électrons inorganiques (e.g. H_2, H_2S) ne peuvent utiliser la voie CBB ou la voie rTCA. C'est alors qu'intervient la voie du bi-cycle 3-HP/malyl-CoA où le CO_2 est réduit en glyoxylate. Le 3-hydroxypropionate est un intermédiaire clé dans cette voie car il associe deux cycles pour aboutir au pyruvate, qui peut ensuite être converti en glycéraldéhyde 3-P comme dans le cycle rTCA. De nombreuses archées chimiolithotrophes utilisent soit (i) le cycle 3HP-4-HB, (ii) soit le cycle DC/4-HB. Chacun de ces cycles autotrophes comprend deux voies connectées dans lesquelles le bicarbonate et/ou le CO_2 est réduit en acétyl-CoA, et ils sont nommés d'après leurs principaux intermédiaires. Quant à la voie de W-L, elle est également utilisée par certains autotrophes strictement anaérobes en utilisant l'hydrogène comme donneur d'électrons, et permet de réduire le CO_2 en acétyl-coA pour les bactéries, et en CH_4 et acétyl-coA pour les archées.

Le processus de carbonatogenèse bactérienne peut dépendre de la disponibilité en CO_2 (autotrophie) et de la disponibilité en matière organique (hétérotrophie). Néanmoins, la capacité de carbonatogenèse en autotrophie est limitée par la disponibilité du CO_2 et la concentrations en ions bicarbonate (Castanier et al., 1998). L'autotrophie est effectuée par les bactéries qui tirent leur carbone cellulaire du CO_2 pouvant avoir une origine diverse (i.e. atmosphère, respiration, fermentation). Quatre grands groupes de **bactéries autotrophes** peuvent ainsi intervenir :

Les **bactéries méthanotrophes :** elles peuvent oxyder le méthane (CH_4) en CO_2, formaldéhyde, méthanol, en utilisant une source d'O_2 comme accepteur terminal en condition aérobie ou en utilisant le sulfate ou les oxydes métalliques comme accepteur

d'électrons en condition anaérobie (Pelsma et al., 2023). Des duos symbiotiques archée/bactérie peuvent exister : par exemple, le soufre peut être réduit par des bactéries grâce à l'aide d'électrons obtenus par l'oxydation du méthane par les archées.

Les **bactéries méthylotrophes** : elles peuvent aussi utiliser des composés réduits à un seul carbone (C1) (e.g. méthanol, formaldéhyde) comme source de carbone pour leur croissance ou des composés à plusieurs carbones ne contenant pas de liaisons carbone-carbone (e.g. éther diméthylique, diméthylamine). Ces dernières sont capables d'assimiler des composés réduits en C1 par le biais du CO_2 via le cycle CBB (Chistoserdova and Kalyuzhnaya, 2018; Sorokin et al., 2007).

Les **bactéries photosynthétiques anoxygéniques** : elles effectuent la photosynthèse sans production d'oxygène. Il s'agit des bactéries vertes ou pourpres, sulfureuses ou non-sulfureuses. Les bactéries sulfureuses ont besoin d'H_2S (généralement issu des processus bactériens hétérotrophes anaérobies) qu'elles oxydent en soufre. Ces bactéries vivent en anaérobiose ou en microaérophilie. Elles possèdent des pigments photosynthétiques particuliers : les bactériochlorophylles (George et al., 2020).

Les **cyanobactéries** effectuant une photosynthèse avec production d'oxygène, qui se distinguent des autres par la présence de chlorophylle A.

Les **bactéries hétérotrophes** vont quant à elles utiliser leur source de carbone à partir du carbone organique, issu initialement de la production primaire. La carbonatogénèse est rendue possible par la production d'ions HCO_3- (CO_2 dissous) liée à l'activité métabolique cellulaire, et/ou par des mécanismes de transport de pompes spécifiques aux métaux.

Plusieurs hypothèses sont proposées quant à l'**origine moléculaire du carbone incorporé dans les carbonates intracellulaires des $_{iACC}$B :**

- Le carbone des carbonates provient du CO_2 gazeux d'origine atmosphérique, ou d'origine mantellique (e.g. manteau sédimentaire avec approvisionnement en permanence de CO_2g) métabolisé et réduit par le cycle rTCA. En supposant que les populations d'$_{iACC}$B soient chimiolithohétérotrophes.
- Le carbone des carbonates provient du CO_2 (sous-produit métabolique) issu de la fermentation (métabolismes anaérobes) par des bactéries chimioorganohétérotrophes.
- Le carbone des carbonates provient du CO_2 (sous-produit métabolique) produit par des bactéries méthanotrophes ou méthylotrophes (chimioautotrophes).
- Dans des conditions thermodynamiquement favorables et selon l'index de saturation vis-à-vis du $CaCO_3$: Le carbone des carbonates provient du CO_2 dissous (ions bicarbonates HCO_3^{2-}) incorporé dans la cellule. Les ions CO_3^{2-} interagissent par la suite avec les réserves de calcium intracellulaire et cette interaction est couplée avec des contrôles cellulaires sur la nucléation et formation du minéral amorphe (ACC) (e.g. cyanobactérie $_{iACC}$B dans les microbialites (Couradeau et al., 2012)).

- Des voies métaboliques encore inconnues.

3.5.3. Le CO_2 : un produit de la méthanotrophie et méthylotrophie

Comme vu précédemment, le CO_2 peut être produit également par un métabolisme très particulier, très lié à celui du CH_4. Les organismes méthylotrophes peuvent utiliser des composés réduits à un carbone (C1), pouvant être le méthanol ou le méthane comme source de carbone, mais pas que. Certaines gammaprotéobactéries peuvent être méthanotrophes (e.g. *Methylococcus capsulatus*). Il est donc possible que les populations d'$_{iACC}$B utilisent des métabolismes en lien avec la méthanotrophie ou la méthylotrophie (comme nous le verrons plus tard avec la chimie du lac Pavin et la présence de $_{iACC}$MTB dans des zones contenant du CH_4). Le CH_4, produit final de la minéralisation anaérobie de la matière organique, joue un rôle clé dans le fonctionnement des écosystèmes et est au cœur de préoccupations sociétales dans le cadre du changement climatique global. Si la production biologique de méthane est très importante pour les archées, son oxydation (méthanotrophie) aérobie et anaérobie au sein des écosystèmes est sous la dépendance d'une grande diversité de microorganismes, bactéries ou archées.

Les bactéries méthanotrophes, très répandues dans les milieux d'eau douce, marins et terrestres, constituent donc un sous-ensemble de méthylotrophes, utilisant des composés monocarbonés. Sur le plan taxonomique, ils appartiennent aux classes *Alphaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria*, et au phylum *Verrucomicrobia* (Farhan Ul Haque et al., 2020). On a longtemps pensé que l'oxydation microbienne du méthane se limitait au métabolisme des bactéries méthanotrophes aérobies dans les environnements oxygénés (Conrad, 2007). Or, il a été récemment montré que l'oxydation anaérobie du méthane (OAM) jouait un rôle important dans le contrôle des émissions de méthane dans les environnements anoxiques des habitats marins et d'eau douce (Yuan et al., 2021).

Toutes les bactéries méthanotrophes **aérobies** utilisent une méthane monooxygénase (MMO) pour oxyder le méthane en méthanol, qui est ensuite oxydé en formaldéhyde ou méthanal (CH_2O) par la méthanol déshydrogénase (MDH). Il existe deux formes de MMO : une enzyme associée à la membrane (i.e. méthane monooxygénase particulaire, pMMO) et une enzyme cytoplasmique (i.e. méthane monooxygénase soluble, sMMO). Quant à l'oxydation **anaérobie** du méthane (AOM), elle peut être médiée indirectement par la réduction de différents accepteurs d'électrons terminaux. Par exemple, l'AOM peut être couplée à la réduction du sulfate. Dans ces processus, les organismes oxydant le méthane vont transférer des électrons à des accepteurs d'électrons externes ou à des espèces microbiennes interdépendantes. En effet, il existe des relations syntrophiques entre les bactéries sulfato-réductrices (SRB) et les archées méthanotrophes : les SRB utilisent le H_2 produit par les archées et peuvent contrôler la quantité de ce dernier, qui, en trop grande quantité, peut bloquer l'activité métabolique des méthanotrophes. Le méthane se diffuse dans l'eau porale des sédiments avec des concentrations croissantes et est oxydé de manière anaérobie par les archées méthanotrophes couplés à la sulfato-réduction pour

former du CO_2 dans les sédiments, riches en sulfate (Drake et al., 2015). Une partie de ce CO_2 peut donc former du carbonate avec le calcium et le magnésium des sédiments environnants. Ainsi, les SRB peuvent jouer un rôle dans l'oxydation anaérobie du méthane qui contribue aux activités du cycle du carbone par la réaction suivante (Barton and Fauque, 2009) :

$$\mathbf{CH_4 + SO_4^{2-} \longrightarrow HCO_3^- + HS^- + H_2O}$$

Plus récemment, des bactéries ont été retrouvées comme étant capables de dénitrifier et d'oxyder le CH_4 en conditions anaérobie. L'oxydation anaérobie dénitrifiante du méthane est un processus récemment découvert, qui représente potentiellement un important puits de CH_4 à l'échelle mondiale (Wei et al., 2022).

3.6. Les carbonates dans le cycle du carbone et des métaux alcalino-terreux

La formation de phases carbonatées a suscité de nombreux questionnements concernant les processus et métabolismes associés, notamment l'étude des facteurs et conditions de précipitation de $CaCO_3$. Toutefois, il est difficile de déterminer les facteurs pouvant expliquer la biominéralisation contrôlée de carbonates par les bactéries car cela nécessite de caractériser des gènes spécifiques et les mécanismes moléculaires impliqués (Görgen et al., 2020).

C'est pourquoi, la formation environnementale de carbonate de calcium ($CaCO_3$) par les bactéries a récemment fait l'objet d'une attention particulière, notamment en raison : (i) de son impact sur les cycles du carbone et du calcium (Herve et al., 2018; Liu et al., 2018), de sa capacité à (ii) cimenter/stabiliser les sédiments et les sols (Terzis and Laloui, 2018) et à (iii) restaurer les monuments en calcaire altéré et en ciment (Anbu et al., 2016), (iv) ou de biorestaurer les sites pollués en métaux lourds et radionucléides (Sr, Ra) par certains métaux alcalino-terreux (AEM) (Mehta et al., 2019; Warren et al., 2001).

En comparaison avec des microorganismes classiques, la biominéralisation d'iACC par les bactéries (e.g. cyanobactéries) permet d'accumuler et de séquestrer une grande quantité d'AEM (e.g. Ca, Mg, Sr, Ba) incorporée dans le carbonate intracellulaire. Toutefois, cette incorporation d'AEM dépend du groupe taxonomique de l'$_{iACC}$B et de la concentration en éléments chimiques environnants biodisponibles (i.e. milieu de culture). Grâce aux approches de culture, les cyanobactéries sont actuellement des modèles d'études (et les seules $_{iACC}$B à être cultivées) pour comprendre les mécanismes moléculaires et chimiques d'incorporation des AEM au sein des iACC. Il existe un mécanisme préférentiel d'absorption des AEM selon les souches et le milieu de culture. Par exemple, Cam *et al.* ont mis en évidence la sélectivité des AEM chez *G. lithophora.* Ils ont montré que cette dernière accumulait préférentiellement du baryum (Ba), puis du Strontium (Sr) et du calcium (Ca) au sein des iACC (Cam et al., 2016). La capacité de *G. lithophora* à séquestrer sélectivement du Sr par rapport à du Ca dans des inclusions intracellulaires est surprenante et intéressante pour des techniques de bioremédiation.

En effet, cette capacité s'étend aux AEM radioactifs tels que le radium (^{226}Ra) et le strontium (^{90}Sr), présents dans l'environnement à l'état de traces comparé au Ca dissous (très élevé). Toutefois, les résultats de Mehta *et al,* suggèrent que la séquestration du ^{90}Sr et du ^{226}Ra n'est pas une fonction partagée par toutes les cyanobactéries, mais un trait spécifique de *G. lithophora* lié à la formation d'iACC (Mehta et al., 2019). Sa capacité unique d'absorber ces AEM radioactifs à des taux élevés (~99 %) en fait un candidat intéressant pour des études ultérieures impliquant la bioremédiation de ces radionucléides. De plus, la présence d'une forte concentration de Ca^{2+} dans la solution environnante n'a pas inhibé l'absorption du ^{90}Sr et du ^{226}Ra par *G. lithophora*.

Plusieurs micro-organismes ont été étudiés pour leur capacité à stocker le Sr ou le Ba à des fins ultimes de concevoir des stratégies de bioremédiation. Néanmoins, la biominéralisation d'iACC semble être une fonction biologique prometteuse et essentielle compte tenu de leur implication dans les cycles biogéochimiques du Ba et du Sr. *G. lithophora* est une candidate potentielle car elle peut fortement accumuler le Ba et le Sr tout en restant viable et en montrant une forte affinité sélective pour ces AEM par rapport au Ca.

Il est donc primordial d'étudier les processus impliqués dans la séquestration du carbone inorganique et des AEM, en surveillant la cinétique de la formation d'iACC par certaines populations de $_{iACC}$MTB dans des conditions contrôlées variables. Comme *Achromatium*, les $_{iACC}$MTB n'ont encore jamais été cultivées.

Description du lac Pavin, un site modèle pour l'étude des bactéries vivant à l'interface oxique-anoxique

Le lac Pavin est un laboratoire à ciel ouvert pour l'étude des bactéries magnétotactiques. Il a été le site d'étude principal durant tous mes travaux de thèse. Cette partie présente donc une synthèse bibliographique sur l'origine, la géochimie et les communautés microbiennes du lac Pavin, dont la connaissance peut permettre de mieux interpréter la présence/biologie des populations de iACCMTB.

1. Présentation générale et historique

Autrefois nommé *Lacus pavens* du latin « lac épouvantable », le lac Pavin a fait l'objet de nombreux récits et légendes mystiques (Meybeck, 2016) (**Figure 37**). Ce lac d'eau douce est situé dans le Massif Central en Auvergne (France), à 1197 m d'altitude (45°29'41' N, 002°53'12"E). Il s'agit d'un maar, c'est à dire un lac de cratère volcanique issu de la rencontre d'une montée de lave et d'une nappe phréatique, dont la formation géologique est datée entre 6900-7000 années (Chassiot et al., 2018). De forme circulaire, le lac présente un diamètre de 750 m et une profondeur maximale de 92 m (Jézéquel et al., 2016).

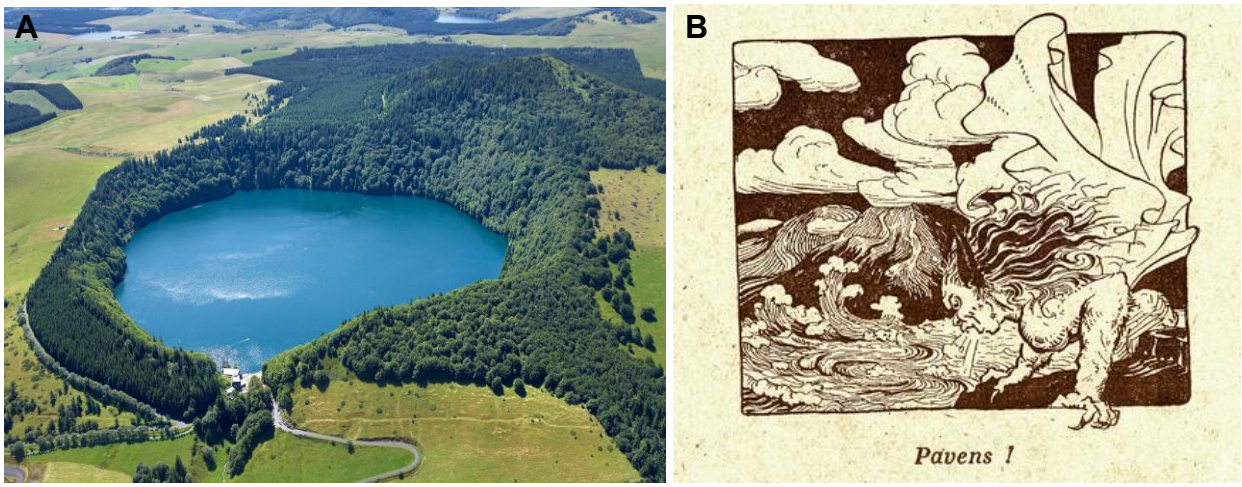


Figure 37 : Présentation du lac Pavin. A) Photographie en vue aérienne du lac Pavin (Crédit : www-la-croix.com). B) La représentation de la légende *Pavin Tourbillons et Tempêtes* mettant en vedette Satan, dans Eusebio et Reynouard Pavin guide (1925) (Meybeck, 2016).

D'après d'anciens récits datant du Moyen-Age, le lac Pavin faisait l'objet d'un grand nombre de croyances en racontant que le diable résidait dans ce lac. Il était également interdit de s'y aventurer en raison de phénomènes de relâchements de « gaz étranges » et de « changements brutaux de couleur de l'eau ». La population n'étant pas en mesure de déterminer sa profondeur, il était même qualifié de « lac sans fond ». Ce n'est qu'à partir du 18ème siècle qu'un groupe de scientifiques a tenté d'analyser toutes ces légendes et

qu'en 1778, Théodore Chevalier estima la profondeur du lac à 92 mètres avec une sonde. Uniquement alimenté par les eaux météoriques ou souterraines, le lac n'abritait aucune espèce animale. En 1859, des salmonidés dont l'Omble chevalier et des écrevisses furent introduits et se sont parfaitement adaptés à cet habitat. La création d'un sentier autour du lac en 1909 a permis de démystifier ce lac en l'ouvrant au public. Toutefois, en 1986, une explosion limnique est survenue au lac Nyos, un lac de cratère volcanique au Cameroun. Cette explosion a déclenché un nuage de gaz et la libération d'importante quantité de CO_2 causant l'asphyxie et la mort de nombreuses personnes (~1700) et animaux (~3000) (Kling et al., 1987). Cette éruption a attiré l'attention sur les maars méromictiques en France (i.e. lac Pavin) et certains volcanologues se sont interrogés sur les risques potentiels de dégazage au lac Pavin et des risques encourus par les habitants de Besse-et-Saint-Anastaise, une commune à proximité et en contrebas du lac. En 1987, une équipe réalisa des études géochimiques approfondies et stipule que les concentrations en CO_2 dissous entre 80 et 90 m de profondeur sont très faibles, comme celles en surface. Une étude plus complète en 1993 affirma que le lac Pavin présente de très faibles risques d'éruption gazeuse car il est approvisionné par de faibles quantités de CO_2 mantellique et que la plus grande partie du CO_2 proviendrait des transformations chimiques de la matière organique (Camus et al., 1993). Quelques années plus tard, Pierre Lavina et Thierry Del Rosso ont observé la présence de plusieurs points de dégazage du CO_2 proches du lac Pavin (Lavina et al., 2009). Un long dépôt de coulée de boue (9 km de long) a également été découvert au niveau du ruisseau de la Couze Pavin, pouvant être associée à un débordement du lac datant de 1300 après J.-C (Sime-Ngando et al., 2016b). Suite à leurs conclusions, un groupe de scientifiques pluridisciplinaire s'est réuni pour réévaluer et quantifier les potentiels risques de dégazage. Albéric *et al*. affirment qu'aucune éruption gazeuse ne peut avoir lieu et que seuls d'importants glissements de terrain, perturbant les sédiments de fond, pourraient générer un dégazage partiel (Albéric et al., 2013).

Les événements décrits dans les légendes peuvent être considérés comme les premières preuves paléolimnologiques d'un dégazage passé du Pavin et/ou d'événements catastrophiques, enregistrées dans les archives sédimentaires. Selon Chapron *et al*. les glissements subaquatiques étaient « suffisamment importants pour être associés à de violentes vagues dans le lac » (Chapron et al., 2011). Ces vagues violentes pouvaient également résulter d'une éruption limnique ainsi qu'une chute brutale du niveau du lac déclenchant des écoulements dans la rivière Couze Pavin. Ainsi, l'ensemble de ces études géologiques et géochimiques ont daté ces événements et certains auteurs n'excluent pas la possibilité d'associer certaines légendes à des phénomènes d'explosions hydrogazeuses sous-lacustres ayant eu lieu au Moyen-Age.

2. Origine volcanique et méromicticité

Le lac Pavin a été formé par une éruption phréato-magmatique (i.e. la rencontre d'une montée de lave avec une nappe phréatique ou rivière souterraine). Il est méromictique, c'est-à-dire qu'il présente la particularité d'être chimiquement stratifié de manière permanente (Sime-Ngando et al., 2016b). En effet, ses eaux de surface oxygénées ne se mélangent pas avec les eaux profondes anoxiques. Ce caractère méromictique peut être expliqué par les caractéristiques morphologiques du lac Pavin. En effet, ce lac de forme circulaire est profond et sa partie inférieure se rétrécie progressivement avec une pente très forte, ce qui ne favorise pas le brassage de la colonne d'eau. Cette stratification a été mise en évidence par Jean Philippe Pelletier dont les recherches limnologiques en 1968 avaient mis en évidence l'existence de deux grands compartiments : (i) le monimolimnion entre 60 et 92m de profondeur, dans lequel les eaux profondes sont stagnantes et non oxygénées et bien isolées du (ii) mixolimnion englobant les eaux de la surface jusqu'à 60m de profondeur brassées annuellement (Berg et al., 2019; Bidaud, 2018; Busigny et al., 2021). En effet, seul le mixolimnion connait un brassage de ses eaux, deux fois par an, quand ses eaux atteignent 4°C, température à laquelle l'eau est la plus dense. Ce phénomène de stratification thermique est également appelé « renversement de densité ». En hiver, le gel peut avoir un impact sur l'efficacité et la durée du brassage de la couche supérieure. Entre ces deux compartiments se trouve le mésolimnion, une zone de transition oxique-anoxique (OATZ) comme dans les sédiments, dans laquelle les conditions redox sont intermédiaires. Cette zone, appelée également redoxcline, peut faire plusieurs mètres de profondeur et varier d'une année à une autre, entre 50 et 60 m (**Figure 38**). Cette OATZ étendue est caractérisée par des zones à forts gradients chimiques.

Les lacs méromictiques ont cette particularité intéressante d'être compartimentalisés en plusieurs zones très distinctes géochimiquement les unes des autres, et pouvant ainsi contenir diverses communautés microbiennes qui varient en fonction de la profondeur. C'est pourquoi le lac Pavin constitue un modèle utile pour étudier les relations entre la structure des communautés microbiennes et la géochimie, tout particulièrement au niveau de l'OATZ qui s'étend sur plusieurs mètres. Cette spécificité facilite l'étude de ce *hotspot* microbien comparé aux zones de gradients des sédiments qui s'étendent généralement sur des distances micro à millimétriques. Un nombre important de travaux a montré que ce lac abrite de nombreuses communautés microbiennes, caractérisées par des populations structurées en fonction des gradients géochimiques et donc en fonction des trois compartiments : (1) le mixolimnion et ses eaux oxygénées et brassées, (2) le mésolimnion représenté par ses eaux faibles en oxygène avec de forts potentiel d'oxydoréduction, (3) le monimolimnion et ses eaux anoxiques et stagnantes. Les parties suivantes présentent donc les principales études associées à la colonne d'eau puis aux sédiments du lac Pavin. La première partie présente les caractéristiques géochimiques de

la colonne d'eau (mixolimnion, mésolimnion et monimolimnion) ainsi que la diversité et physiologie des microorganismes. Bien qu'elle soit beaucoup moins documentée, la seconde partie est consacrée aux études de caractérisation de la géochimie des sédiments (de surface et profonds) et des populations microbiennes associées.

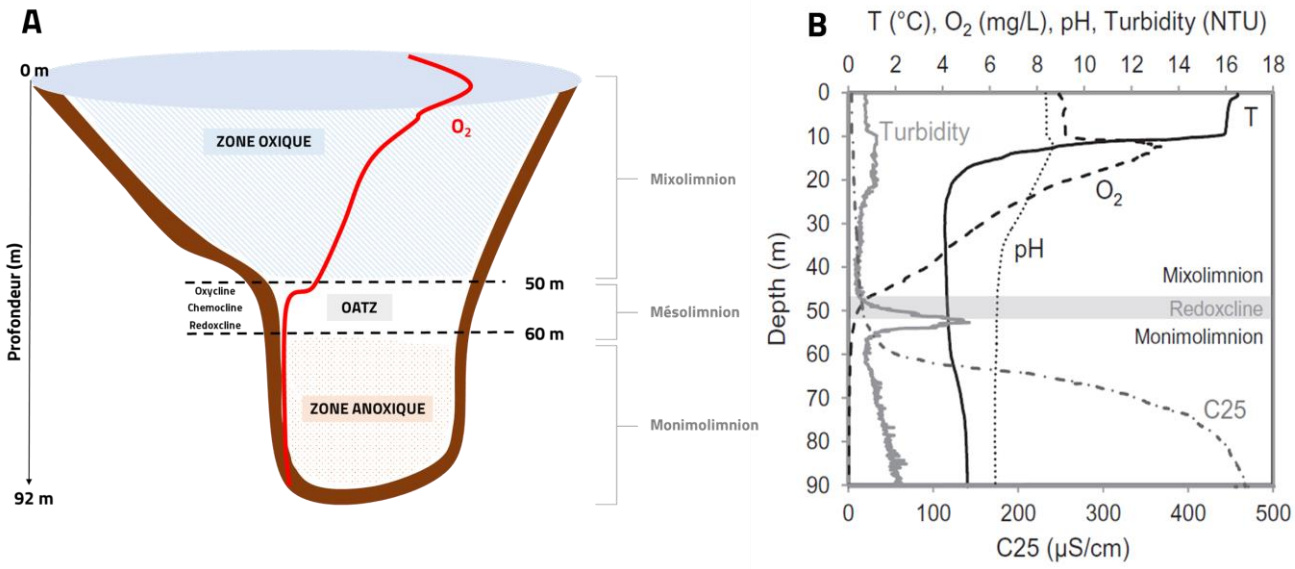


Figure 38 : Stratification chimique du lac Pavin méromictique. A) Représentation schématique simplifiée du lac Pavin stratifié en permanence avec une couche oxique (mixolimnion), une zone de transition oxique-anoxique (OATZ) dans la partie du mésolimnion, et une couche anoxique en permanence (monimolimnion). B) Profils géochimiques de la température (T°C), O_2 (mg/L), pH, turbidité (NTU), conductivité C25 (µS/cm) en fonction de la profondeur de la colonne d'eau du lac Pavin et des différentes couches (mixolimnion, redoxcline, monimolimnion). Cosmidis *et al.* (2012)

3. Caractéristiques de la colonne d'eau du lac Pavin

3.1. Géochimie de la colonne d'eau du lac Pavin

Le mixolimnion et le monimolimnion possèdent des propriétés biogéochimiques très distinctes. Ces compartiments sont séparés entre eux par une interface, l'oxycline ou redoxcline, présentant d'importants gradients physicochimiques. Il est à noter que les profondeurs de l'oxycline (i.e. OATZ) peuvent varier en fonction de la saison (effet de saisonnalité) et certaines conditions météorologiques (favorisant le brassage du mixolimnion).

A partir de 60 m, les composés oxydés (e.g. O_2, SO_4^{2-}, NO_3^-) (**Figure 39 ; 40**) disparaissent complètement, tandis que la concentration des composés réduits (Fe^{2+}, Mn^{2+}, H_2S, DIP) augmente fortement (**Figure 40**) (Busigny et al., 2016; Lopes et al., 2011; Rivas-Lamelo et al., 2017). Les profils illustrés dans la **Figure 40** montrent que certaines espèces chimiques dissoutes telles que le Mn^{2+} et le SO_4^{2-} sont fortement concentrées au niveau de l'oxycline (~60 m de profondeur) aussi appelée redoxcline. En effet, la concentration en Mn^{2+} augmente au niveau de l'OATZ, avec un pic à ~61 m de profondeur, suggérant une dissolution rapide des oxydes de manganèse (**Figure 40**). Quant au sulfate dissous (SO_4^{2-}), sa concentration diminue drastiquement à partir de 60 m et disparait

complètement à partir de 65 m (zone anoxique). La disparition du sulfate est étroitement liée avec l'augmentation de la concentration du soufre à l'état réduit (H_2S) suggérant la réduction des sulfates en sulfures par les bactéries. En effet, ces fortes concentrations sont corrélées avec l'activité métabolique de certains groupes taxonomiques microbiens (e.g. bactéries réductrices de manganèse, bactéries sulfato-réductrices, bactéries ferro-oxydantes) nécessitant ces espèces chimiques en donneur ou accepteur terminal d'électrons. L'oxycline présente ainsi un fort gradient vertical d'oxydoréduction entre l'eau oxygénée supérieure et l'eau dépourvue d'oxygène inférieure.

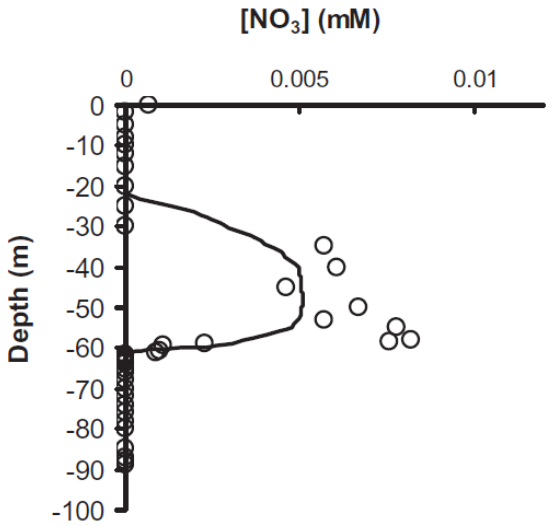


Figure 39 : Profils de concentration mesurés et modélisés des nitrates NO_3 en juin 2007 dans la colonne d'eau du lac Pavin. Les cercles blancs représentent les mesures, et les lignes les concentrations simulées. Lopes *et al.* 2011.

L'azote est également présent dans le mixolimnion sous sa forme oxydée. L'apparition d'un pic de nitrate (NO_3^-) au niveau de la redoxcline (**Figure 39**) peut être corrélée avec les bactéries réductrices des nitrates, juste en dessous de la redoxcline (Lopes et al., 2011) et suggère que l'azote est présent sous forme réduite (i.e. NH_4^+) dans le compartiment anoxique, à partir de 60 m. Toutefois, le N_2 peut également être produit par le processus de dénitrification dans la zone anoxique (juste en dessous du maximum de nitrate). Ce pic de nitrate dans le lac Pavin peut être corrélé avec les bactéries réductrices des nitrates, juste en dessous de la redoxcline (Lopes et al., 2011).

Le lac Pavin est aussi décrit comme un lac ferrugineux, compte tenu de ses fortes concentrations en Fe au niveau de la colonne d'eau (Bura-Nakic et al., 2009; Busigny et al., 2016; Cosmidis et al., 2014). En effet, dans les eaux anoxiques du lac Pavin, ces profils de concentration d'espèces chimiques montrent une augmentation progressive et drastique du Fe^{2+} (passant de 0 à 1200 µM) et du Mn^{+2} (passant de 0 à 30 µM à 90 m) (Busigny et al., 2016) (**Figure 40**). De par les conditions oxiques, le fer est efficacement confiné sous la forme d'espèces ferriques insolubles telles que le Fe(III) solide, par oxydation avec l'O_2 ou d'autres oxydants (e.g. NO_3 -, PO_4-, MnO_2) dans le mixolimnion. Ces particules de Fe(III)

se réduisent en partie en Fe(II) soluble dans les eaux dépourvues d'oxygène et sédimentent au fond du lac par réaction avec la matière organique. Les flux benthiques de Fe(II) soluble et de phosphate soluble diffusent vers le haut de la colonne d'eau et est finalement réoxydé en Fe(III) au niveau de l'OATZ. Ce processus, est aussi connu sous le nom de "roue du fer" et témoigne de l'importance du cycle du Fe dans la biogéochimie du lac Pavin (**Figure 41C**).

Le cycle du Fe est étroitement corrélé avec celui d'autres éléments chimiques présents dans la colonne d'eau. Il existe une relation entre le Fe et le phosphore (P) dissous, mais aussi avec le soufre (S), le manganèse (Mn) et la matière organique (Busigny et al., 2016).

Les concentrations de Fe et de P dissous présentent une relation linéaire (**Figure 41A**) suggérant un lien significatif entre les cycles du Fe et du P dans le lac. Cette corrélation confirme l'existence de phosphates de Fe et/ou d'oxyhydroxydes de Fe présentant une forte adsorption de phosphate. D'autre part, des variations de la turbidité ont été observées autour de la redoxcline (~50 m) et peuvent être corrélées aux particules contenant du Fe dans la matière particulaire suspendue (SPM) (**Figure 41B**). Les mesures de turbidité peuvent donc être utilisées comme une approximation de ces particules riches en Fe. Ainsi, le couplage entre les études chimiques, isotopiques, minéralogiques et de modélisation a permis de proposer une vision intégrée des cycles biogéochimiques du Fe et du P au lac Pavin, et de leur connexion avec les cycles du Mn, du S et du C (**Figure 41C**) (Busigny et al., 2016).

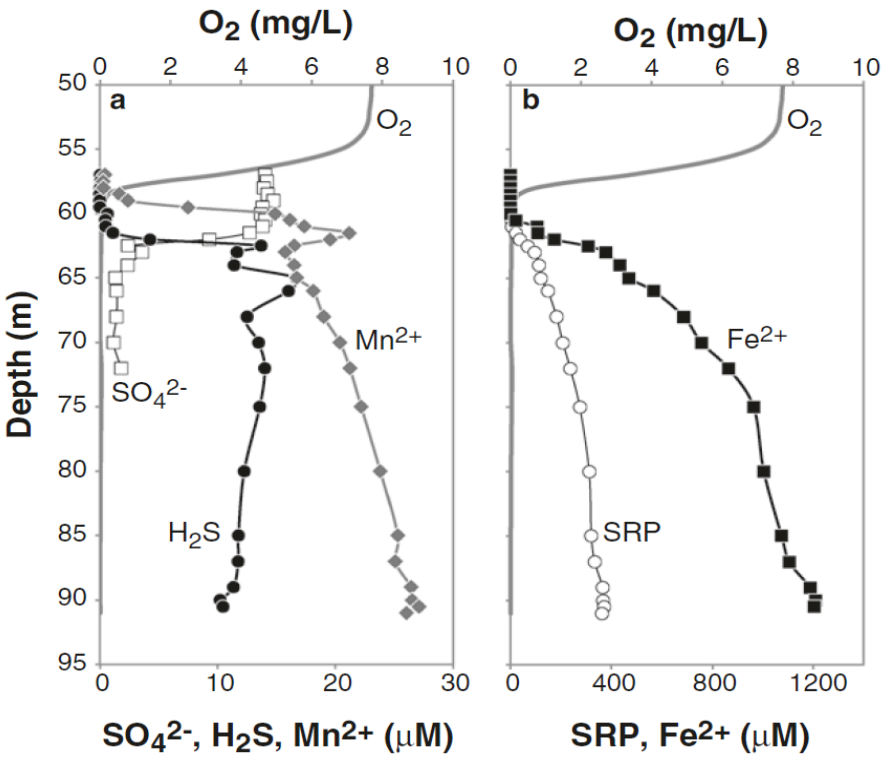


Figure 40 : Profils des concentrations de l'O_2, du soufre oxydé (SO_4^{2-}), du manganèse à l'état réduit (Mn^{2+}), du soufre à l'état réduit (H_2S), du fer à l'état réduit (Fe^{2+}) et du phosphore réactif soluble (SRP) en µM dans les échantillons de la colonne d'eau du lac Pavin, prélevés en juillet 2007. Busigny *et al.* (2016).

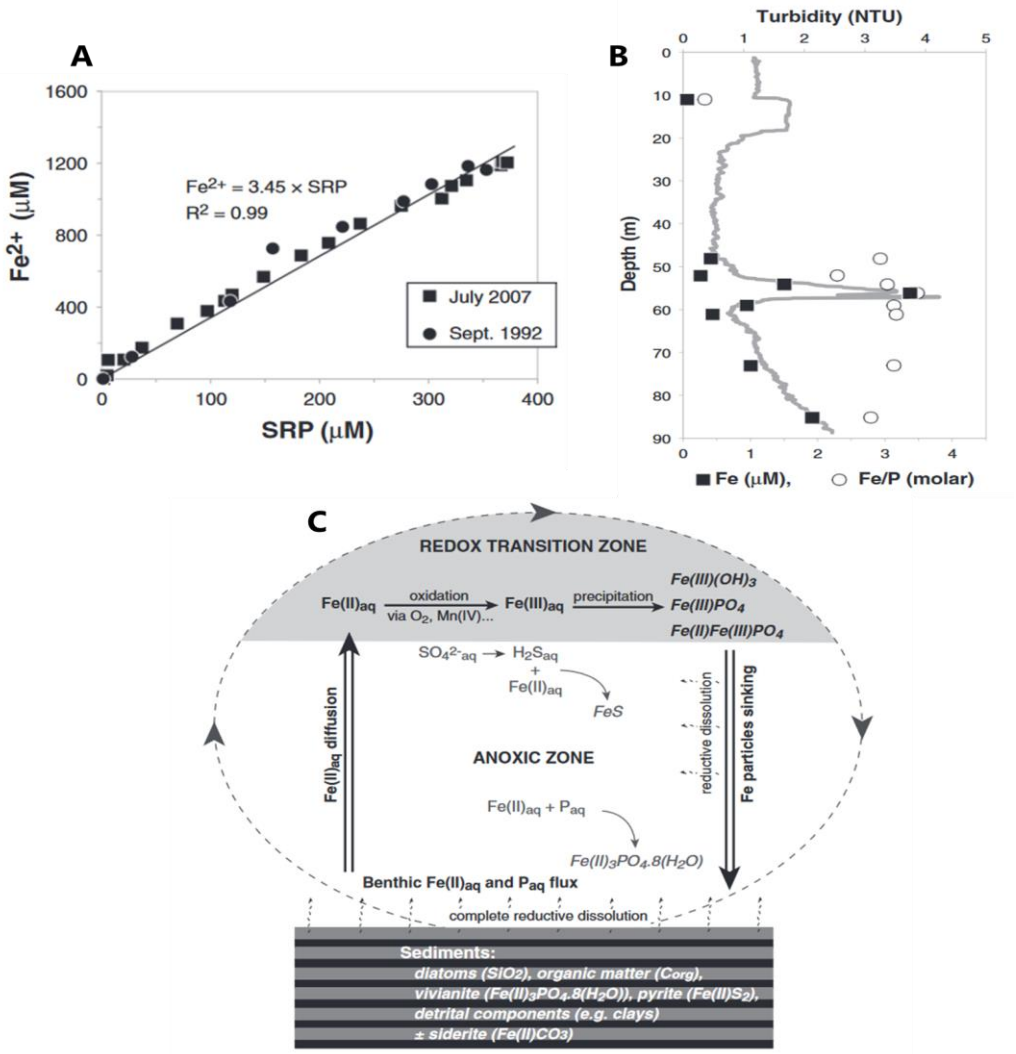


Figure 41 : Lien entre les cycles du fer, du phosphore et du soufre. A) Relation entre les concentrations de fer dissous (Fe^{2+}) et les concentrations de phosphate dissous (SRP pour *soluble reactive phosphorus*) dans les échantillons d'eau du lac Pavin. B) Profil de turbidité dans la colonne d'eau du Lac Pavin, comparés aux concentrations en Fe (carrés noirs) et au rapport Fe/P (cercles blancs) des particules en suspension (SPM). C) Modèle schématique illustrant le cycle biogéochimique du Fe dans le lac Pavin. La "roue du fer" est mise en évidence en noir et en gras. Seuls les processus dans la zone anoxique (monimolimnion) et la zone de transition redox (identifiée par la zone gris clair) sont représentés. Busigny *et al.* 2016a

D'un point de vue minéralogique, il existe une relation importante entre le Fe et le S entre l'OATZ de la colonne d'eau et les sédiments du lac Pavin. En effet, les roches sédimentaires sont composées de pyrite ($Fe(II)S_2$) ou de son précurseur (e.g. FeS) (Busigny et al., 2016), ce dernier se formant juste en dessous de l'OATZ, où le soufre est à l'état réduit (H_2S) et réagit avec le Fe(II) dissous (**Figure 41C**). La minéralogie du Fe et du P est également très liée, en raison des particules de phosphates de fer $Fe(III)PO_4$ précipitées au niveau de l'OATZ grâce aux conditions redox de cette zone rendant disponible certains accepteurs et donneurs d'électrons. Ces particules sont dissoutes dans le monimolimnion anoxique, rendant disponibles le $Fe(II)_{aq}$ et le P_{aq}, précurseurs impliqués dans formation des roches de vivianite ($Fe(II)_3PO_4.8(H_2O)$) (**Figure 41C**) (Busigny et al., 2016; Cosmidis et al., 2014).

Le cycle du carbone est également particulier dans la colonne d'eau du lac Pavin. Il existe un lien important entre matière organique, CO_2 et le CH_4 avec différents réservoirs et flux entre compartiments médiés par la chimie ou la biologie. Le monimolimnion se distingue de la zone oxique par ses fortes concentrations en matière organique dissoute (DOC), en carbone inorganique dissous (DIC) et en méthane (CH_4) (Jézéquel et al., 2016) (**Figure 42**). Contrairement au DIC et au CH_4, le DOC augmente régulièrement en dessous de 65 m de profondeur pouvant être associé à l'oxydation anaérobie du CH_4. Le DIC peut avoir deux origines principales : (i) résultant des processus biochimiques (minéralisation de la MO) se produisant dans la colonne d'eau et dans les sédiments ou (ii) issu de l'influence volcanique apportée au lac par un apport d'eau minérale.

Plusieurs études se sont questionnées sur les différentes voies possibles de transport du CH_4 dans la colonne d'eau du lac Pavin (Biderre-Petit et al., 2019; Borrel et al., 2011; Lehours et al., 2016). Une étude suggère que le processus d'oxydation du méthane dans la colonne d'eau du lac Pavin pourrait avoir lieu à la fois en aérobiose et en anaérobiose suivant les variations saisonnières (Lopes et al., 2011). Ce métabolisme explique le chevauchement entre les voies d'oxydation aérobie et anaérobie du CH_4. D'autre part, les concentrations de NO_3^- et SO_4^{2-} (**Figure 43A**) dans la colonne d'eau peuvent être corrélées avec le processus d'oxydation du CH_4. En effet, des auteurs ont modélisé le taux d'oxydation du CH_4 et le taux le plus élevé est observé à une profondeur d'environ 60 m pouvant correspondre à la réduction des nitrates (**Figure 43B**). L'oxydation anaérobie du CH_4 par le Fe et le SO_4^{2-} contribue également à la consommation du CH_4 dans la colonne d'eau (Lopes et al., 2011).

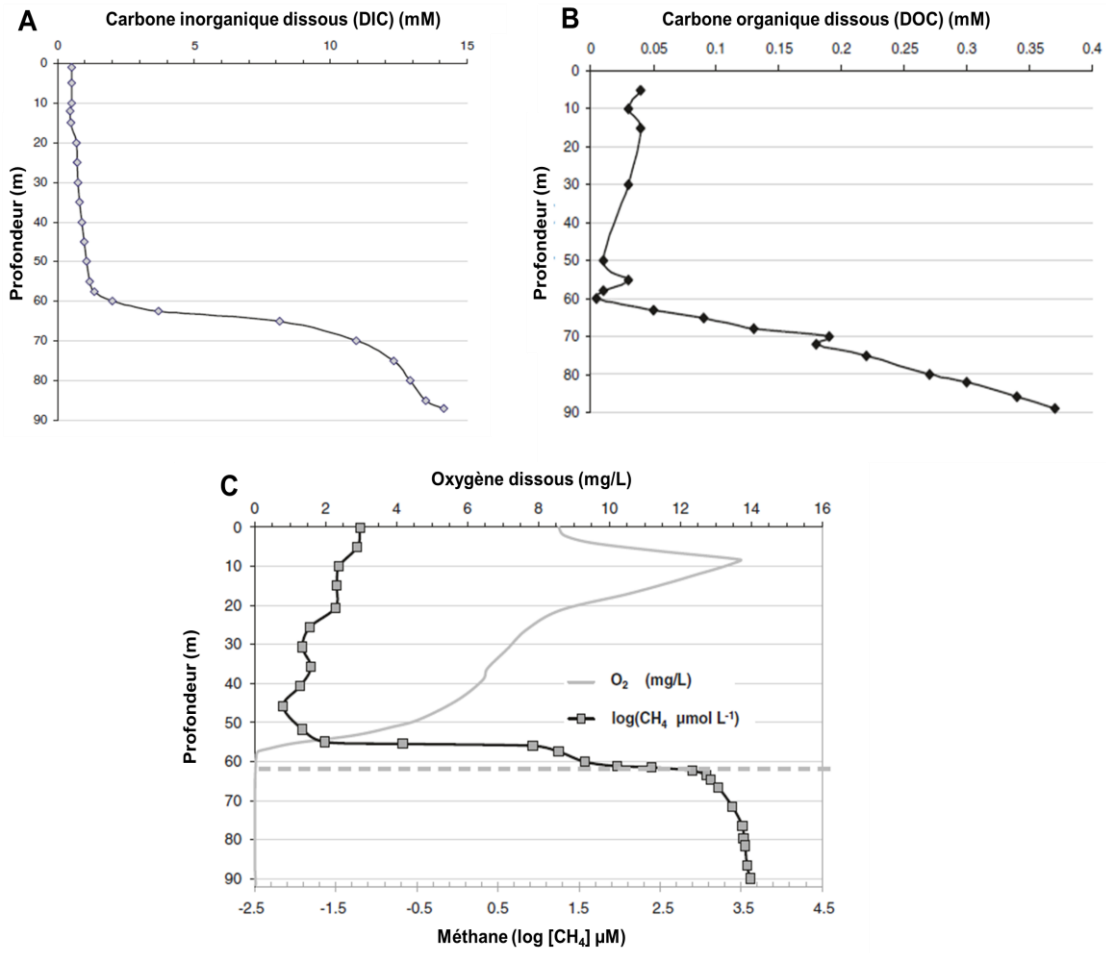


Figure 42 : Profils de concentrations en matière organique dissoute, en carbone inorganique dissous et en méthane dans la colonne d'eau du lac Pavin. Profils de concentration (A) du carbone inorganique dissous (DIC), (B) du carbone organique dissous (DOC) (C) de l'oxygène dissous (O_2)) et du méthane (CH_4) en fonction de la profondeur de la colonne d'eau du Lac Pavin. (Jézéquel *et al.*, 2016).

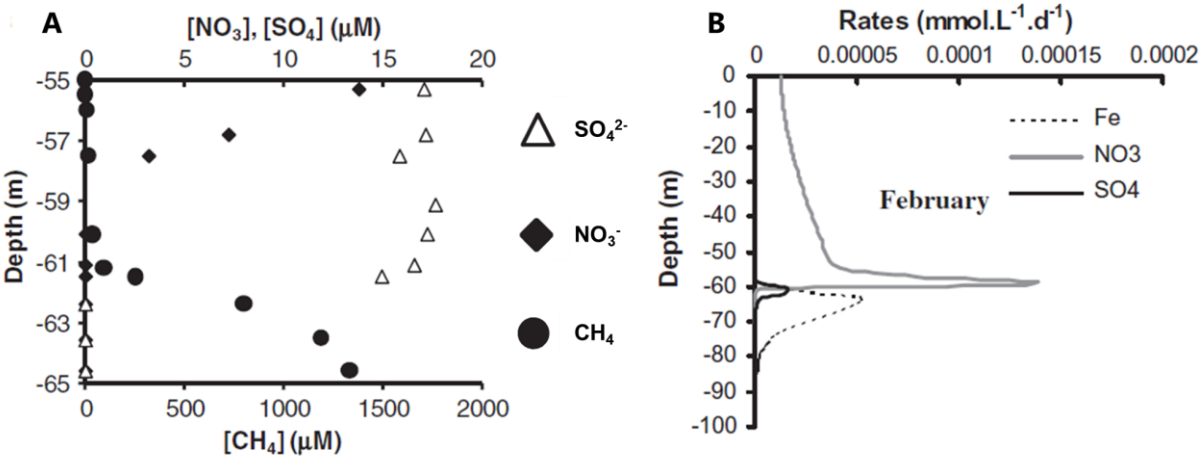


Figure 43 : Corrélation entre les sulfates, nitrates, et méthanes dans la colonne d'eau du lac Pavin. A) Profils de concentration des composés sulfates (SO_4^{2-}), nitrates (NO_3^-) et méthane (CH_4) en µM en fonction de la profondeur de la colonne d'eau. B) Modélisation des taux d'oxydation du CH_4 (mmol. L^{-1}. d^{-1}) par la réduction du fer (Fe), des nitrates (NO_3^-) et des sulfates (SO_4^{2-}). Lopes *et al,* 2011.

3.2. Diversité taxonomique et fonctionnelle des communautés procaryotiques de la colonne d'eau du lac Pavin

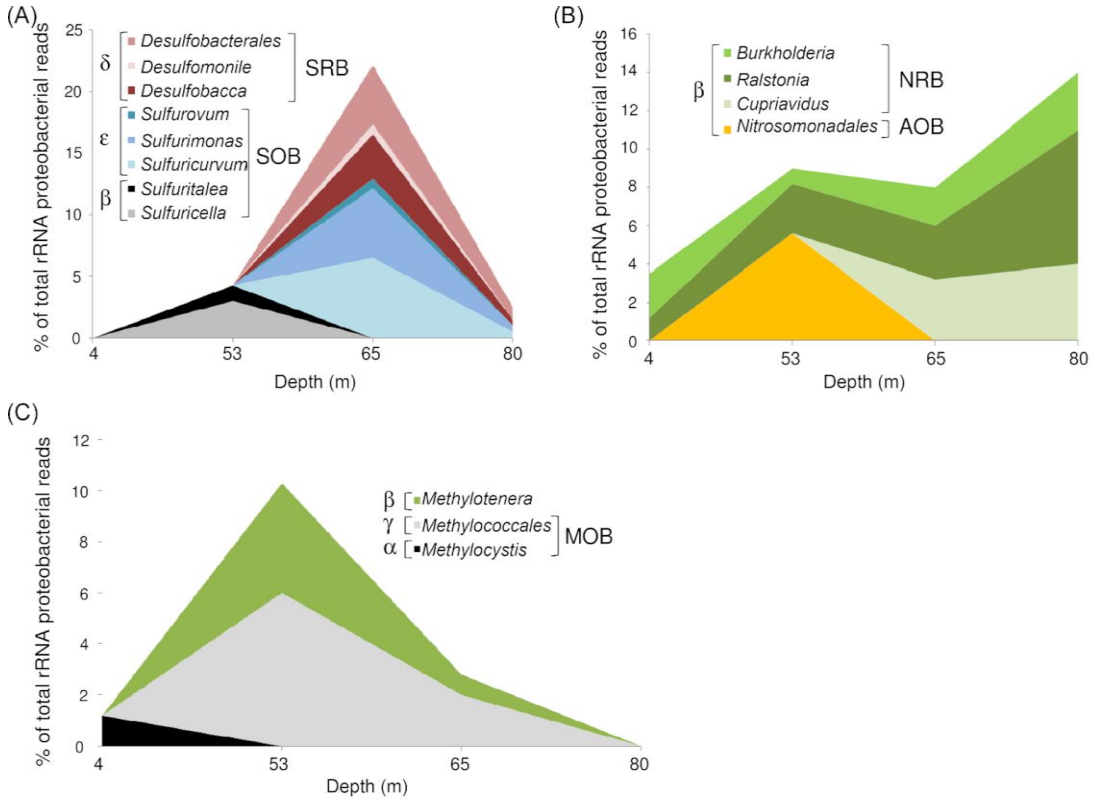
La colonne d'eau du lac Pavin a suscité l'intérêt de nombreuses études visant à caractériser la diversité fonctionnelle et génotypique des microorganismes habitant le mixolimnion, le mésolimnion (*oxycline/redoxcline/chemocline*) et le monimolimnion (Yvan Bettarel et al., 2003; Biderre-Petit et al., 2019; Colombet et al., 2006; Lehours et al., 2007, 2005; Lepère et al., 2006; Monchy et al., 2011). Ces études ont aussi mis en relation la structure des communautés, d'un point de vue fonctionnel ou spécifique avec la géochimie aux différentes profondeurs. Elles ont permis d'identifier, de quantifier et de modéliser l'impact des communautés microbiennes dans les cycles biogéochimiques.

La majorité de ces travaux, menés à la fois par des écologues de l'Université Clermont-Auvergne (UCA) et par des géochimistes de Paris (IPGP, IMPMC), ont étudié la structure des communautés de procaryotes incluant bactéries et archées en lien avec la géochimie de la colonne d'eau et aux différentes profondeurs. Le mixolimnion ainsi que le mésolimnion sont des zones couvrant une variété de niches écologiques et abritent ainsi une communauté microbienne très diversifiée d'un point de vue fonctionnel (Biderre-Petit et al., 2019). L'oxycline et la redoxcline (i.e. OATZ) du lac Pavin constitue une zone modèle pour l'étude saisonnière des populations bactériennes microaérophiles et aimant les environnements à forts gradients chimiques, telles que les MTB, car elle s'étend sur plusieurs mètres de profondeur (Berg et al., 2019; Bidaud, 2018; Busigny et al., 2021; Monteil et al., 2021; Rivas-Lamelo et al., 2017). Enfin, le monimolimnion anoxique en permanence, est également un site d'étude idéal pour l'étude des populations anaérobes telles que les méthanogènes et méthanotrophes (Biderre-Petit et al., 2019; Borrel, 2011; Lehours et al., 2016, 2007, 2005).

Le long de la colonne d'eau du lac Pavin, la distribution des phylums bactériens est structurée différemment en fonction des profondeurs (Biderre-Petit et al., 2019). En effet, les populations représentées par les *Alphaproteobacteria* sont distribuées préférentiellement au niveau des zones suboxiques (à 65 m) alors que le groupe des *Actinobacteria* se retrouve au niveau des couches beaucoup plus oxygénées (i.e. mixolimnion). Tout comme les *Actinobacteria*, le groupe des *Bacteroidetes* semble suivre la même tendance. Les premiers mètres de profondeur sont quant à eux marqués par l'abondance des *Cyanobacteria* (4 m) qui diminue au-delà de cette profondeur, pouvant être corrélé avec la présence de lumière, de température et le pic d'oxygène (entre 0 et 10 m de profondeur de la colonne d'eau). De par leur quasi-absence dans la couche oxique du mixolimnion, les populations représentées par les *Thermodesulfobacteriota* sont distribuées préférentiellement à des profondeurs où les sulfates ont disparu (i.e. à partir de l'oxycline) et être corrélées à la présence du soufre réduit (H_2S) en lien avec le métabolisme des SRB. Tandis que d'autres communautés disparaissent progressivement dans le monimolimnion, d'autres apparaissent progressivement, telles que les archées (i.e. *Methanomicrobiales*) (>65 m). Il existe donc une diversité phylogénétique importante

et insoupçonnée de bactéries présentes dans ce compartiment anoxique (Berg et al., 2019; Biderre-Petit et al., 2019; Lehours et al., 2007)

En s'intéressant de près au cycle du soufre et à ses différentes formes oxydées dans le mixolimnion et réduites dans le monimolimnion, certains groupes taxonomiques métabolisant le soufre semblent stratifiés chimiquement. Par la présence de marqueurs génétiques (i.e. ARNr 16S) conservés chez les bactéries, il a été possible d'étudier la distribution des populations de bactéries oxydant le soufre (SOB) et des SRB dans la colonne d'eau. Il existe une stratification des groupes taxonomiques à l'échelle du genre, pouvant être corrélée au potentiel redox et à l'oxygène dissous. En effet, parmi les *Pseudomonadota* SOB, les genres *Sulfuricella* et *Sulfuritalea* sont principalement distribués au niveau de l'OATZ (i.e. dans cette étude, l'oxycline est à 53 m) tandis qu'ils disparaissent totalement dans le monimolimnion (**Figure 44A**). A l'inverse, les genres *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas* et *Sulfurovum* ne sont pas représentés dans le mixolimnion. A noter qu'en fonction des articles, l'utilisation de la taxonomie NCBI est parfois privilégiée par rapport à la classification GTDB ou lors de l'étude la classification GTDB n'existait pas encore et peut conduire à des conclusions différentes quant à l'affiliation taxonomique. Par exemple, les deux genres précédemment cités appartiennent à la classe des *Betaproteobacteria* selon la taxonomie du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) et à la classe des *Gammaproteobacteria* selon la classification de *Genome Taxonomy* Database (GTDB) avec laquelle elles ont fusionné. Il en est de même concernant le genre *Sulfurimonas*, affilié à deux phylums différents selon la taxonomie utilisée : *Pseudomonadota* (NCBI) et *Campylobacterota* (GTDB). Les groupes de SRB affiliés à l'ordre des *Desulfobacterales* (NCBI) sont présents uniquement dans le monimolimnion (**Figure 44A**) pouvant être corrélé avec les concentrations importantes de soufre réduit et l'absence d'oxygène dans ce compartiment.



<u>Figure 44</u> : Activités fonctionnelles des groupes taxonomiques de la colonne d'eau du lac Pavin liées aux principaux cycles biogéochimiques du soufre, azote et méthane, en fonction de l'appartenance aux séquences d'ARNr (16S et 23S) selon la classification NCBI. (A) Groupes taxonomiques potentiellement impliqués dans les métabolismes du soufre, (B) groupes taxonomiques potentiellement impliqués dans les métabolismes de l'azote, et (C) groupes taxonomiques potentiellement impliqués dans la consommation de méthane (*Methylocystis* et *Methylococcaceae*) ainsi que l'abondance du genre *Methylotenera* non-méthanotrophe et méthylotrophe. Acronymes : bactéries oxydant l'ammonium (AOB); bactéries oxydant le méthane (MOB) ; bactéries réduisant les nitrates (NRB) ; bactéries oxydant le soufre (SOB); bactéries sulfato-réductrices (SRB). Biderre-Petit et al., 2019

Le cycle de l'azote a également son importance dans la colonne d'eau du lac Pavin. Le potentiel de nitrification par les bactéries a été observé uniquement au niveau de l'oxycline avec les *Nitrosomonadales* (taxonomie NCBI) (**Figure 44B**), des bactéries connues pour oxyder l'ammonium (AOB). Contrairement, les bactéries dénitrifiantes (NRB) n'ont pas une distribution stratifiée en fonction de la profondeur, excepté le genre *Cupriavidus* (taxonomie NCBI) absent du mixolimnion (**Figure 44B**).

Comme vu précédemment, le mixolimnion se distingue bien du monimolimnion par ses faibles teneurs en carbone (DOC, DIC) et en CH_4. La présence de ces composés carbonés dans la colonne d'eau est étroitement liée à l'activité métabolique de certains groupes bactériens. En effet, des bactéries potentiellement impliquées dans la consommation de composés carbonés en C1 (e.g. méthanol, méthane) affiliées au genre *Methylocystis* sont uniquement retrouvées dans le mixolimnion et l'oxycline. Néanmoins, ces bactéries méthanotrophes/méthylotrophes sont beaucoup moins représentées en comparaison des populations représentées par les *Methylococcales,* deux fois plus abondantes au niveau de l'oxycline (**Figure 44C**). Le genre *Methylotenera* non-méthanotrophe et méthylotrophe est également très abondant à cette profondeur bien qu'il soit présent aussi dans les profondeurs comprises entre 4-80 m (**Figure 44C**).

La présence de gradients d'oxygène, de nitrates, et de Fe^{2+} au niveau de l'oxycline constitue une niche géochimique potentielle pour de nombreuses populations, notamment (i) les bactéries réductrices de fer ou ferriréductrices (IRB), (ii) les bactéries oxydant le fer (IOB). Les IRB et IOB semblent avoir un impact sur la minéralogie des précipités de fer dans la colonne d'eau et les sédiments. Par exemple, les populations ferriréductrices représentées par les genres *Geothrix*, *Geobacter* et *Rhodoferax* sont distribuées préférentiellement dans le compartiment anoxique (**Figure 45A**) (Berg et al., 2019). Une espèce très connue de ce genre bactérien (*R. ferrireducens*) est capable de réaliser la réduction dissimilatrice du Fe(III) avec l'acétate comme source d'énergie (Finneran et al., 2003) soulignant sa forte contribution dans le cycle du fer dans d'autres lacs stratifiés. Quant aux populations d'IOB, elles sont représentées principalement par le genre *Gallionella*, particulièrement abondant dans la zone anoxique, à 10 m sous l'oxycline (**Figure 45B**). Ces résultats suggèrent que les *Gallionella* sont adaptées à des niveaux d'oxygène extrêmement faibles et qu'elles occupent cette niche étroite entre les gradients d'O_2 et de Fe^{2+}. Les autres groupes dominants sont représentés par *Ferrimicrobium* et *Ferrithrix* et trouvés à l'oxycline en grande majorité (**Figure 45B**). Les espèces de ces genres sont connues pour oxyder ou réduire le fer en fonction des conditions d'oxydoréduction. La faible abondance des autres groupes représentés par *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter* et *Rhodomicrobium* (< 10 % des IOB) suggère que l'oxydation phototrophique du fer est peu probable dans la colonne d'eau du lac Pavin (Berg et al., 2019).

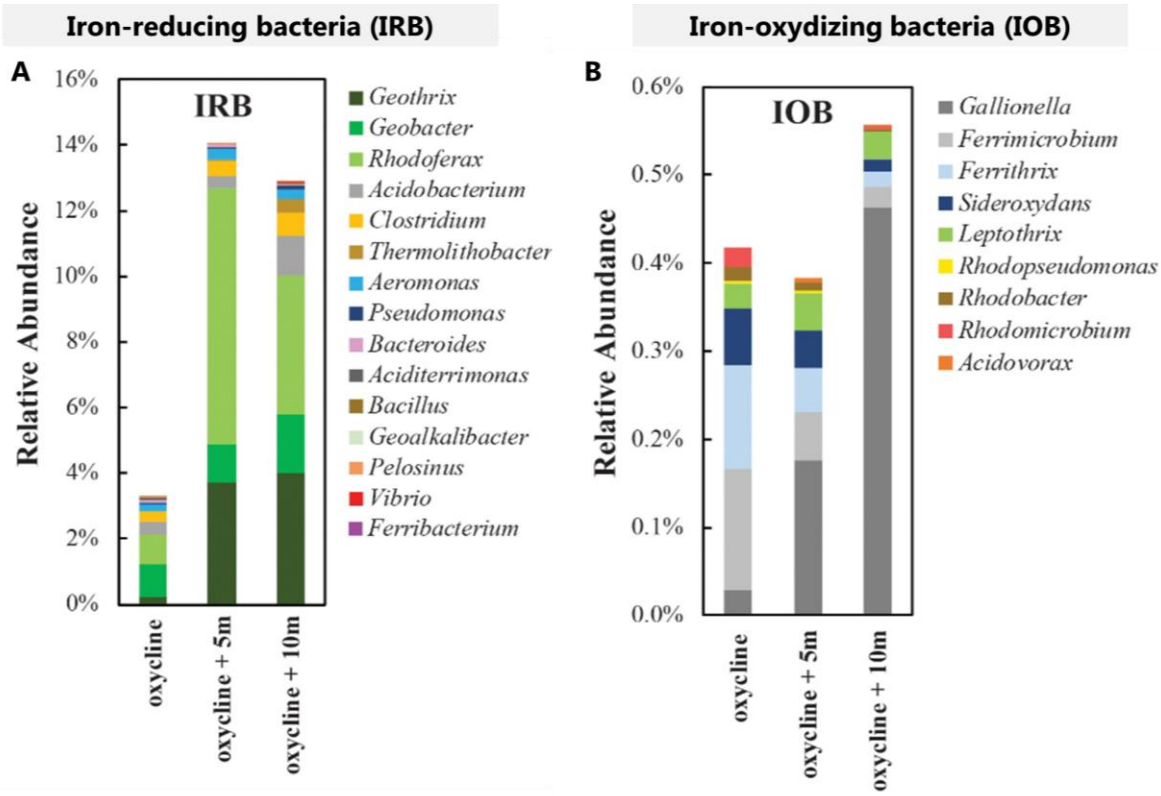


Figure 45 : Diversité des bactéries métabolisant le fer dans l'oxycline et dans le monimolimnion du lac Pavin. Les séquences ont été classées sur la base des meilleurs résultats de BLAST, et les bactéries putatives métabolisant le fer ont été identifiées sur la base de l'affiliation phylogénétique avec (A) les bactéries réduisant le fer = IRB, (B) les bactéries oxydant le fer = IOB. Utilisation de la taxonomie NCBI. Berg *et al* (2019).

L'oxycline, la redoxcline et la chemocline constituent, elles aussi, une niche biogéochimique bien spécifique. Comme mentionné dans les sections précédentes, cette zone est marquée par de faibles teneurs en oxygène, et par la présence d'un pic de conductivité spécifique et de turbidité ainsi qu'une diminution drastique du potentiel redox (**Figure 46**). Cette niche semble être l'endroit idéal réunissant toutes les conditions nécessaires au développement et à la survie de certaines populations bactériennes. Ces dernières incluent les MTB dont la plupart sont affiliées aux *Alphaproteobacteria* : à la famille des *Magnetococcaceae* (Bidaud et al., 2022; Rivas-Lamelo et al., 2017) et à la famille des *Azospirillaceae* (Monteil et al., 2021).

Parmi les populations bactériennes présentes dans cette niche, certaines populations de MTB ont été systématiquement observées avec de la magnétite (Fe_3O_4) intracellulaire. Certaines d'entre elles ont été observées avec des morphologies différentes, en forme de coccus (MTBc) formant des granules accumulant des polyphosphates intracellulaires (PolyP) (Bidaud et al., 2022; Rivas-Lamelo et al., 2017) et certaines en forme de bâtonnet produisant des carbonates de calcium intracellulaires amorphes (iACC *forming rods* ; **Figure 47**). La structuration de ces communautés de MTB a été étudiée le long de la colonne d'eau en relation avec les niches géochimiques. Un seul pic d'abondance est reporté pour les populations formant des iACC (52 m) contre deux pics pour les MTBc (51.3 et 52 m) (**Figure 47A**). Ces observations couplées aux profils géochimiques suggèrent que ces deux pics représentent deux niches différentes (**Figure 47B**). Plusieurs

variables géochimiques peuvent être corrélées à l'abondance des populations de MTB. En effet, les concentrations cellulaires de MTBc et de MTB totale sont significativement corrélées avec la concentration de phosphore particulaire (**Figure 47C**). *A contrario*, aucune variable n'a été significativement corrélée à la concentration cellulaire de bâtonnets formant des iACC.

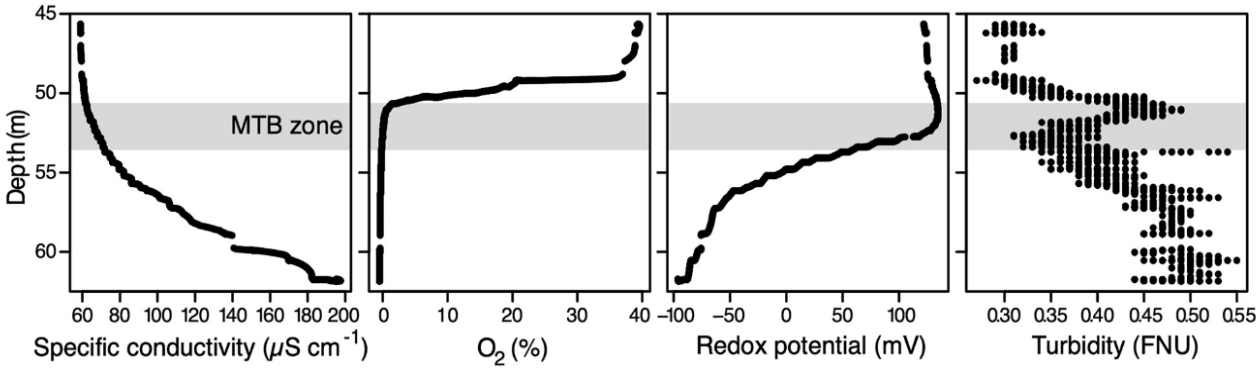


Figure 46 : Profils physico-chimiques de profondeur dans la colonne d'eau du lac Pavin mesurés *in situ* le 30 octobre 2019. La zone gris clair correspond à la zone où le pic de distribution des bactéries magnétotactiques (MTB) a été identifié, c'est-à-dire la couche d'eau habitée par les MTB (Bidaud *et al.* 2022).

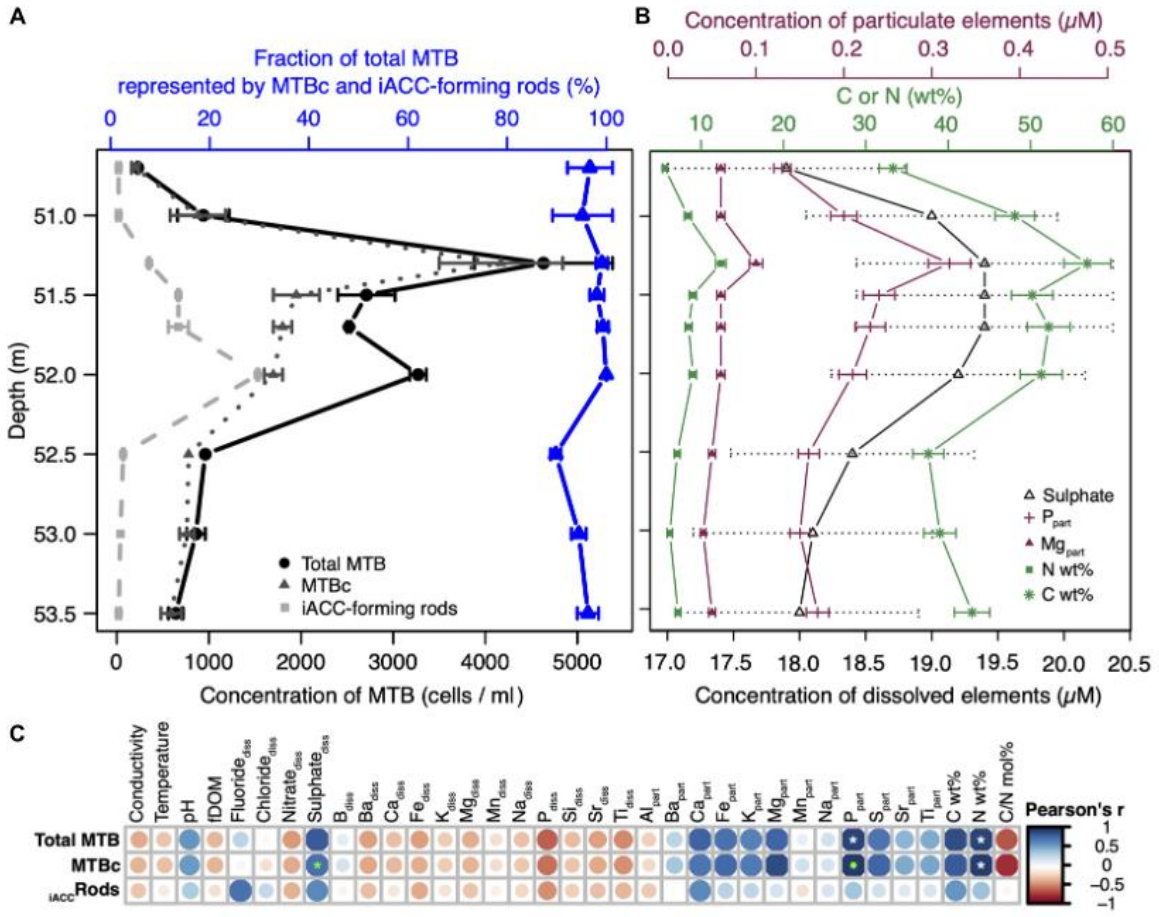


Figure 47 : Relations entre la structure et l'abondance des populations de MTB et les caractéristiques environnementales de la colonne d'eau. (A) Concentration cellulaire des MTB totale et des deux principaux morphotypes : les bâtonnets formant des iACC et les MTBc, pour les neuf profondeurs échantillonnées. La fraction des MTB totales représentée par ces deux morphotypes est indiquée pour chaque profondeur. (B) Profils de concentration des différentes variables géochimiques significativement et positivement corrélées avec les MTB totale et/ou les MTBc en utilisant les tests de corrélation de Pearson et de Spearman. L'azote et le carbone organique particulaire sont exprimés en pourcentage en poids humide (wt%) de la matière organique particulaire totale. Les barres d'erreur représentent l'erreur absolue maximale sur les mesures (±5% pour le sulfate dissous et l'azote et le carbone organique particulaire, ±7,5% pour le phosphore et le magnésium particulaires, respectivement). (C) Analyse statistique de la corrélation entre les variables environnementales et les concentrations cellulaires de MTB totales, de MTBc et de bâtonnets formant des iACC. La taille et la couleur des cercles sont liées à la valeur du coefficient de corrélation (ou r), ce qui signifie que plus le cercle est grand et foncé, meilleure est la corrélation. Les cercles bleus et rouges correspondent respectivement à des corrélations positives et négatives. Les étoiles blanches et vertes indiquent des corrélations linéaires (test de Pearson) ou monotones (test de Spearman) significatives, respectivement. Un point vert indique que les deux tests sont statistiquement significatifs. Bidaud *et al*. 2022.

Quant à lui, le monolimnion, marqué par son anoxie totale et ses fortes teneurs en CH_4, DIC et DOC a fait l'objet d'une attention particulière, notamment les études qui s'intéressent aux populations microbiennes anaérobes strictes. En effet, la communauté microbienne la plus abondante dans le monimolimnion est représentée par les archées, où elles participent activement au cycle du carbone, (lui-même connecté à celui du soufre) (Lehours et al., 2005). Les méthanogènes identifiées seraient majoritairement affiliées aux familles des *Methanosarcinaceae* et *Methanomicrobiaceae* (**Figure 48A**). Bien qu'elles soient détectées au niveau du mésolimnion (50 m) et à l'oxycline (60 m) à de faibles concentrations, les *Methanosarcinaceae* sont préférentiellement distribuées au niveau de la sub-chemocline (>70m) (**Figure 48A**). De la même manière, les concentrations

cellulaires de *Methanomicrobiaceae* sont représentées par un pic à 80 m de profondeur, et leur abondance est négligeable dans les autres parties de la colonne d'eau. De manière surprenante, une densité élevée de *Methanobacteriaceae* a également été détectée mais uniquement à l'interface oxique-anoxique du mésolimnion (Lehours et al., 2005). Ces observations suggèrent une potentielle corrélation entre l'abondance des *Methanosarcinaceae* et les fortes teneurs en CH_4 et témoignent que ce groupe pourrait être à l'origine de la majeure partie du méthane formé dans la colonne d'eau. En effet, les concentrations de CH_4 dans la couche d'eau anoxique du lac Pavin sont corrélées avec l'abondance des *Methanosarcinales* (**Figure 48B**).

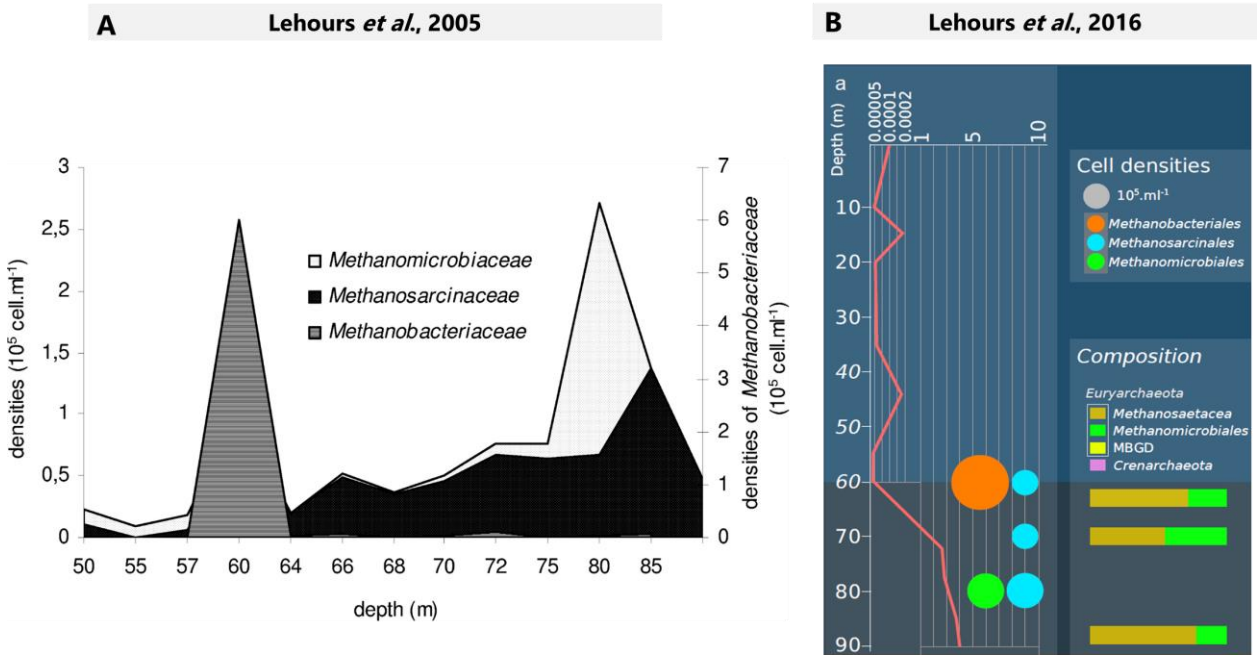


Figure 48 : Les méthanogènes dans la colonne d'eau du lac Pavin. A) Profils du nombre de cellules colorées avec les sondes spécifiques de certaines familles d'Archées : MB1174 (*Methanobacteriaceae*), MSMX860 (*Methanosarcinaceae*) et MG1200 (*Methanomicrobiaceae*) (105 cellules ml^{-1}) d'après Lehours *et al*. (2005). B) Profils de méthane et des méthanogènes dans le lac Pavin. (a) Représentation schématique des profils de CH_4 dans la colonne d'eau oxique (0-60 m), dans la colonne d'eau anoxique (60-92 m). Les abondances des *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales* et *Methanomicrobiales* sont indiquées conformément à Lehours *et al.* (2016).

3.3. Diversité taxonomique et fonctionnelle des autres microorganismes de la colonne d'eau du lac Pavin

Bien qu'ils aient un rôle crucial dans le fonctionnement des écosystèmes, la diversité des eucaryotes microbiens dans les habitats d'eau douce avec des gradients chimiques est très peu explorée et décrite. Néanmoins Lepère *et al*. se sont intéressés à la diversité des microorganismes eucaryotes dans la colonne d'eau du lac Pavin en fonction des saisons (Lepère et al., 2016, 2006). Des populations de microeucaryotes semblent spécifiques au monimolimnion. Parmi cette diversité, les *Choanoflagellida* sont majoritairement représentées et dans une moindre mesure les *Alveolata* (*Ciliophora* et *Dinophyceae*), les *Fungi* (*Dikarya* et *Chytrides*), les *Haptophyceae*, des *Rhizaria*, *Viridiplantae* et les

Stramenopiles. Bien qu'ils ne soient pas les groupes taxonomiques majoritaires du mixolimnion, les *Alveolata* et les *Fungi* sont les groupes plus actifs et sont représentés par des espèces capables de métabolismes en aérobie. Les eucaryotes pigmentaires tels que les Haptophycées et les Chlorophycées, sont également présents et actifs dans cette zone, ce qui ouvre des questionnements concernant leur métabolisme (Lepère et al., 2016) .

La diversité des virus a également suscité l'attention en raison de leurs capacités lytiques et de leur rôle dans la régulation des communautés procaryotiques (archées et bactéries). Bien qu'ils semblent abondants au niveau de la colonne d'eau du lac Pavin, leur distribution en fonction des profondeurs semble peu documentée. Toutefois, certaines études réalisées au lac Pavin se sont intéressées de près à leur diversité phénotypique et taxonomique et ont quantifié leur contribution dans la boucle microbienne (e.g. activité lytique bactérienne) (Sime-Ngando et al., 2016a). Les premières descriptions se sont basées sur le phénotype des virus : forme de la particule, présence ou absence de queue ou de tête (i.e. capside). La diversité des virus au lac Pavin est dite « endémique », avec des morphotypes viraux très contrastés. Il semblerait qu'il existe des phénotypes viraux spécifiques au mixolimnion et au monimolimnion. En effet, des études saisonnières sur la profondeur du lac Pavin ont montré que la diversité morphologique des virus variait en fonction des gradients associés à la profondeur de la colonne d'eau (Colombet and Sime-Ngando, 2012) et suggèrent que les virus sont plus diversifiés dans le monimolimnion que dans le mixolimnion.

D'autre part, l'activité lytique des virus est l'une des principales causes de mortalité microbienne dans les systèmes aquatiques. C'est pourquoi des études saisonnières ont été menées au lac Pavin afin d'estimer l'impact des virus lytiques sur les communautés bactériennes (Y. Bettarel et al., 2003; Colombet et al., 2006). L'ensemble de ces résultats soulignent que deux grands acteurs sont importants dans la régulation des communautés bactériennes au lac Pavin : (i) les protistes flagellés brouteurs et (ii) les virus (Yvan Bettarel et al., 2003; Sime-Ngando et al., 2016b) (**Figure 49**).

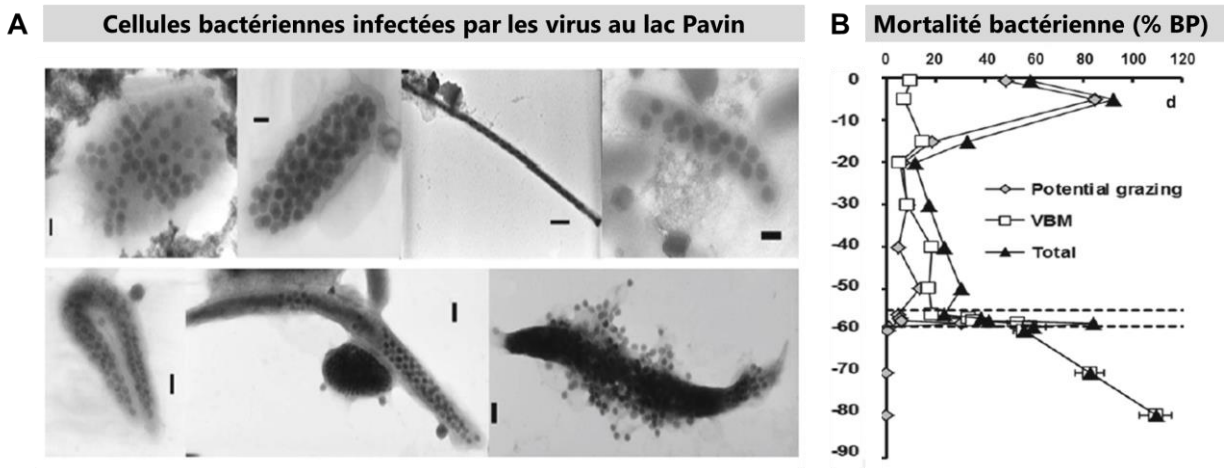


Figure 49 : **Infection des communautés bactériennes par les virus au lac Pavin**. A) Images de microscopie électronique en transmission (MET) de cellules hôtes bactériennes infectées par des phages matures au lac Pavin (bar d'échelle : 100 nm). B) Variations verticales de la mortalité des cellules bactériennes liées au cycle lytique des virus (VBM) et potentiellement liée au broutage par des hétérotrophes nanoflagellés. Figures de (Sime-Ngando et al., 2016)

La présence de bactéries du Candidate Phyla Radiation (CPR) et des phages a récemment été reportée dans la colonne d'eau du lac Pavin (Jaffe et al., 2023) et souligne une diversité microbienne largement sous-estimée dans cet environnement géochimique particulier. Ils rapportent notamment le potentiel métabolique des *Parcubacteria* à participer à la fixation du carbone inorganique via la RuBisCO. Ces observations suggèrent l'existence d'une diversité microbienne encore inconnue dans la colonne d'eau du Lac Pavin et mettent en avant la nécessité de découvrir et d'étudier cette biodiversité. Des populations encore inconnues, abondantes et saisonnièrement fluctuantes de "Nanoparticules Aster-Like" (ALNs) avec des caractéristiques morphologiques typiques et uniques ont été découvertes au lac Pavin (Colombet et al., 2019). Bien que la question de la nature vivante ou non de ces nanoparticules ne soit pas encore résolue, leurs caractéristiques atypiques relancent le débat sur le volume cellulaire minimal pour une forme de vie libre. Des expériences sont en cours pour explorer la nature exacte des ALNs et identifier les facteurs biotiques et abiotiques impliqués dans la régulation de leur dynamique.

4. Caractéristiques des sédiments et de l'eau interstitielle

4.1. Minéralogie et géochimie des sédiments du lac Pavin

En comparaison avec la colonne d'eau, les études géochimiques menées sur les sédiments du lac Pavin sont beaucoup plus rares. Toutefois, certaines se sont intéressées de près à l'identification des **phases minérales** composant les sédiments profonds. La vivianite a été identifiée comme la phase majoritaire dans les sédiments du fond du lac Pavin à 92 m de profondeur (Cosmidis et al., 2014). Dans une moindre mesure, des phases cristallines comprenant l'oxyde de Mn, ainsi que des phases détritiques (i.e. formées partiellement de débris) telles que l'illite (minéral argileux) et l'albite (minéral de la famille des feldspaths) ont été recensées (Cosmidis et al., 2014). D'autres études suggèrent également la présence de pyrite dans les sédiments (Viollier et al., 1997). Le Fe est en effet enfoui dans les sédiments sous forme de divers minéraux ferreux, tels que la vivianite, la pyrite et la sidérite (Busigny et al., 2016). La précipitation de la vivianite semble résulter des fortes concentrations de Fe^{2+} générées dans la partie inférieure du monimolimnion par la dissolution réductrice des oxydes de fer et des phosphates de fer et de la porosité des sédiments (Cosmidis et al., 2014).

Viollier *et al*. (1997) se sont intéressés à la composition minéralogique des particules au-dessus de l'interface eau-sédiment et des sédiments. Les compositions des particules provenant de pièges à particules situées à 85 m de profondeur (soit 7 m au-dessus du fond du lac) et celles des sédiments provenant d'une carotte de 20 cm (profondeur non précisée dans l'étude, suggérant qu'il s'agit du fond à 92 m) ont été analysées et comparées. Les sédiments et les particules décantées sont essentiellement composés de squelettes de diatomées (*Aulacosira italica*, *Asterionella formosa*) (Viollier et al., 1997). Les particules présentes à 85 m sont sphériques et poreuses et caractérisées par une forte abondance de Fe avec un rapport Fe/P proche de celui de la vivianite ($Fe_3(PO_4)_2.8H_2O$) (Viollier et al., 1997). Leurs résultats sont renforcés par la sursaturation en vivianite dans les eaux du monimolimnion. Ainsi, la vivianite et les autres phases minérales phosphatées peuvent réguler la concentration de phosphore (P) dans les eaux interstitielles du sédiment. Quant à l'analyse des sédiments, hormis les frustules de diatomées et quelques matériaux détritiques (e.g. feldspaths, kaolinite et mica), des agrégats sphériques composés de pyrite (FeS_2) ont été identifiés (Viollier et al., 1997). On considère généralement que la pyrite se forme grâce au monosulfure de fer (FeS), considéré comme son précurseur. Les formes oxydées du Fe et de P ne sont pas présentes dans les sédiments.

Outre les analyses minéralogiques, certains paramètres physiques et chimiques des sédiments (e.g. porosité, composition chimique, et concentration en éléments dissous) (Viollier et al., 1997) ont pu être analysés sur différentes profondeurs à l'aide de carottages (**Figure 50**). La porosité des sédiments tend à légèrement diminuer (4%) sur

une profondeur de 20 cm (**Figure 50A**). Les teneurs en Molybdène (Mo) et en Uranium (U) (mmol/g de sédiments) augmentent considérablement en dessous de la limite oxique-anoxique, représentée par l'interface eau-sédiment (**Figure 50C**). Les auteurs de cette étude suggèrent qu'une réaction de dissolution se produit au fond du lac pour l'ensemble des éléments Baryum (Ba), Mn, Fe, Vanadium (V), Cobalt (Co), Rubidium (Rb), Molybdène (Mo), Césium (Cs) et Uranium (U) (Viollier et al., 1997, 1995). Cette hypothèse est renforcée notamment par la présence d'un pic de concentration de certains éléments à l'interface eau-sédiment. Par exemple, le pic de Ba dissous est particulièrement important à cette localisation (**Figure 50B**). Les concentrations de manganèse et de fer présentent également un pic juste au-dessus de la limite oxique-anoxique (Viollier et al., 1997).

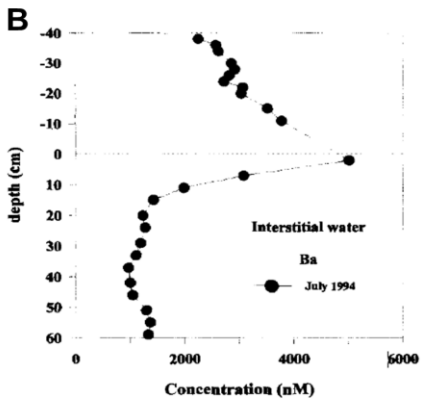
Dans le but de quantifier les flux de carbone organique dans le lac Pavin, certains auteurs se sont intéressés aux voies de transport du CH_4, et donc à sa capacité d'être métabolisé par les microorganismes (i.e. capables d'oxyder le CH_4 en aérobie et en anaérobie). Bien que la méthanogenèse se produise principalement au niveau des couches d'eau anoxiques, la concentration de CH_4 dans le lac Pavin serait due au flux de CH_4 provenant du compartiment sédimentaire. En effet, Lopes *et al*. suggèrent que la majorité du méthane du lac serait formé au niveau des sédiments (Lopes et al., 2011).

A

Porosity of sediment versus depth

Depth (cm)	Porosity (%)
0	98.2
1.5	97.9
3	97.5
4.5	97
5.3	96.6
8	96
9.5	95.8
11	95.6
12.5	95.7
14	95.8
15.5	95.2
17	95.3
18.5	94.9
20	94.6

B



C

Chemical composition of the sediment and buried fluxes for the elements

	Depth (cm)				
	2.5	4.5	7.5	10	13
Fe (mmol/g of sed)	42.8	450	450	450	450
Mn	9.8	7	11.5	27	13
V	2.99	3.45	3.37	2.85	3.79
Co	43	42	52	53	70
Rb	70	69	140	114	120
Mo	161	205	191	188	215
Cs	6.8	9.4	12.8	12	14.8
Ba	869	860	675	595	730
U	2.4	3.4	4.8	4.9	7.7

Figure 50 : Etudes géochimiques des sédiments du lac Pavin. A) Porosité des sédiments en fonction de la profondeur. B) Profil de concentration du Ba dissous en fonction de la profondeur. C) Concentration des éléments chimiques Fe, Mn, V, Co, Rb, Mo, Cs, Ba, U en fonction de la profondeur. Viollier et al., 1997.

4.2. Etudes microbiologiques

Les lacs méromictiques d'eau douce sont des écosystèmes rares et présentent un grand intérêt pour les écologues microbiens, notamment en raison de leurs couches anoxiques permanentes, abritant des communautés microbiennes dépendantes du climax (i.e. état d'équilibre final d'une succession écologique) (Borrel et al., 2012c). Comme vu précédemment, les sédiments du lac Pavin réunissent ces conditions et offrent la possibilité d'étudier des paramètres physico-chimiques et la diversité microbienne qu'ils abritent. En comparaison avec la colonne d'eau, la diversité des communautés microbiennes dans les sédiments du lac Pavin a été peu explorée. Néanmoins, l'eau interstitielle des sédiments profonds (>92 m de profondeur) a fait l'objet de quelques études s'intéressant à certaines populations anaérobes, telles que les archées (Borrel et al., 2012; Lehours et al., 2016, 2005). Une souche méthanogène *Methanobacterium lacus* sp. 17A1 a été isolée des sédiments profonds du lac Pavin (Borrel et al., 2012b). La structure et la composition des populations d'archées ont été analysées sur une profondeur de 40 cm et montrent que la distribution des lignées d'archées varie tout le long de la carotte sédimentaire (**Figure 51**). En fonction de la profondeur, les méthanogènes du genre *Methanosaeta* et *Methanomicrobiales* sont progressivement remplacées par des lignées d'archées non cultivées « *Marine Benthic Group-D* (*MBG-D*) » et « *Miscellaneous Crenarchaeal Group* (*MCG*) » (Borrel et al., 2012c) (**Figure 51D**).

De fortes concentrations en CH_4 dans la couche profonde (**Figure 51A**) ont été détectées, alors qu'à cette profondeur, les archées méthanogènes ont été reportées en faibles abondances et proportions. Aux vues de ces résultats surprenants, et de la diminution de la concentration en CH_4 dans la couche intermédiaire (**Figure 51A**), les auteurs suggèrent que des lignées d'archées non-méthanogènes pourraient être impliquées dans le cycle du CH_4 (Borrel et al., 2012c). Les tendances opposées entre les abondances des méthanogènes et des lignées non cultivées (MBG-D et MCG) pourraient s'expliquer par (i) des conditions de croissance différentes ou opposées et (ii) la présence d'éléments nutritifs essentiels en profondeur (matières en décomposition) provenant des méthanogènes utiles pour les représentants de lignées non cultivées et non méthanogènes.

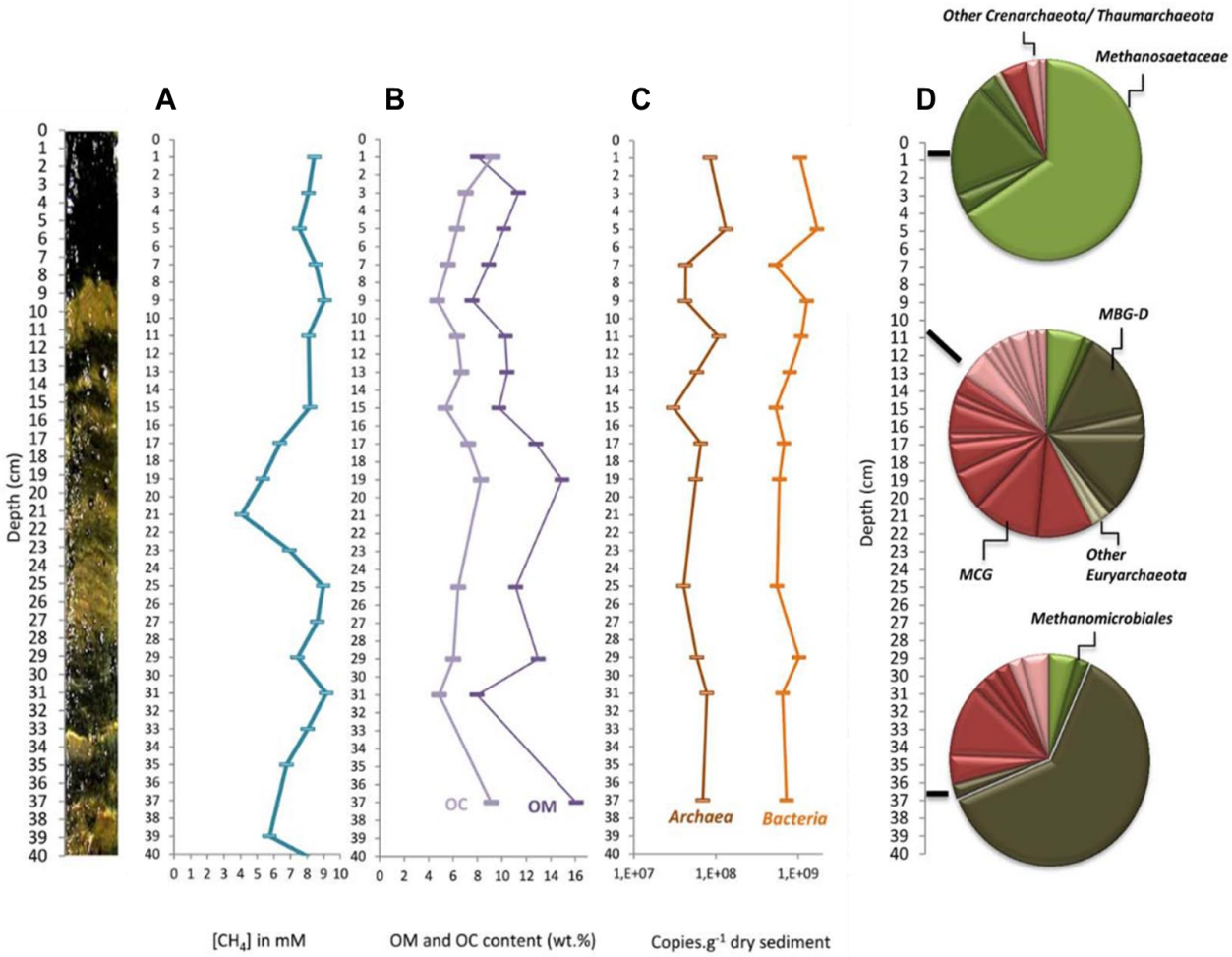


Figure 51 : Abondance, distribution et diversité taxonomique des communautés d'archées et de bactéries en fonction de la profondeur des sédiments et des paramètres géochimiques le long de la carotte sédimentaire du lac Pavin. (A) Profil du méthane (concentration en mM) le long de la carotte sédimentaire (40 cm de profondeur). (B) Contenu en matière organique (MO) et en carbone organique (CO) déterminé à partir de la carotte sédimentaire. (C) Abondance des bactéries et des archées le long de la carotte sédimentaire. (D) Fréquence des lignées d'archées dans les banques de clones construites à partir d'échantillons prélevés à 0-2 cm, 10-12 cm et 36-38 cm dans la carotte de sédiments. Les segments dans les cercles correspondent à des OTUs regroupant des séquences avec une similarité de 97%. Borrel *et al,* 2012c.

Plus récemment, une grande diversité de virus dans les sédiments anoxiques profonds et permanents du lac Pavin a été découverte (Borrel et al., 2012a). L'analyse de carottes de sédiments profonds a révélé des morphologies de virus jamais auparavant signalées dans les systèmes d'eau douce. La distribution verticale des virus et des procaryotes le long de la carotte sédimentaire (**Figure 52**) a pu être corrélée par une relation dynamique trophique (« trophodynamique ») grâce à l'observation de procaryotes infectées à toutes les profondeurs (Borrel et al., 2012a).

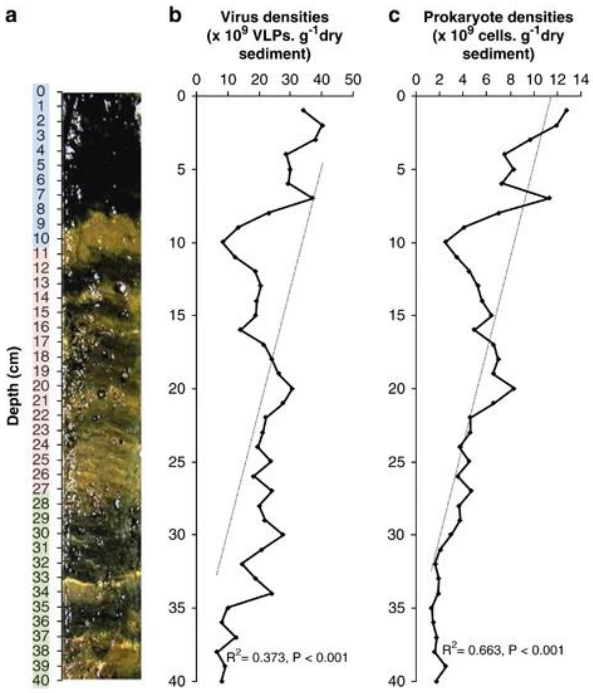


Figure 52 : **Corrélation trophique entre les densités des virus et des procaryotes dans une carotte provenant des sédiments profonds du lac Pavin.** (a) Photo de la carotte de 40 cm prélevée dans le lac Pavin, (b) distribution verticale des densités des virus (x10^9 VLPs par gramme de sédiment sec), (c) distribution verticale des densités procaryotes (x10^9 cellules par gramme de sédiment sec). Borrel *et al*. 2012a.

A l'exception des communautés en lien avec le cycle du CH_4 (e.g. méthanogènes et méthanotrophes), la diversité taxonomique et fonctionnelle des procaryotes habitant l'eau porale des sédiments profonds reste très peu étudiée. Ceci peut être expliqué par la complexité d'étudier l'interface eau-sédiments. En effet cette interface est généralement décrite comme une couche très fine, avec des conditions réductrices et oxydantes se chevauchant sur quelques micromètres, rendant cette zone très complexe à étudier. Toutefois, une étude récente s'est intéressée à la composition microbienne (à l'échelle du phylum) de l'eau interstitielle des sédiments profonds (Jaffe et al., 2023) (**Figure 53**). Les sédiments profonds sont majoritairement représentés par des groupes *Chloroflexi* (NCBI), *Cryosericota* (NCBI), *Caldiserica* (NCBI), *Bipolaricaulota* (NCBI), l'embranchement DPANN des archées, et d'une variété de méthanogènes. De plus, des CPR (Candidate Phyla Radiation) ou *Patescibacteria*, des bactéries généralement parasites d'autres bactéries, ont été détectées à la fois dans la colonne d'eau du lac et très faiblement dans les sédiments (Jaffe et al., 2023).

La compréhension du fonctionnement du lac Pavin peut être améliorée en associant à chaque profondeur des sédiments, des voies métaboliques putatives utilisées par les microorganismes stratifiés eux-mêmes verticalement. En recherchant des gènes marqueurs des voies impliquées dans le métabolisme du monocarbone (C1), la fixation du carbone et le métabolisme du CH_4, Jaffe *et al.*, ont attribué à l'aide de génomes la présence ou l'absence de fonctions métaboliques à l'ensemble des bactéries et des archées

(Jaffe et al., 2023). Bien que le compartiment sédimentaire soit anoxique, leurs résultats montrent que la capacité d'oxydation aérobie du CO et l'oxydation du formate sont possibles. Les voies de fixation du carbone dans les sédiments ont également toute leur importance. Le potentiel génétique de fixation du CO_2 par la voie W-L et par le cycle rTCA est principalement associé à la zone anoxique du lac et aux sédiments. Cette étude au lac Pavin montre que même dans les sédiments, la profondeur et l'oxygène peuvent structurer la composition des communautés microbiennes et les capacités métaboliques liées au cycle du carbone, ces dernières étant stratifiées également spatialement (Jaffe et al., 2023).

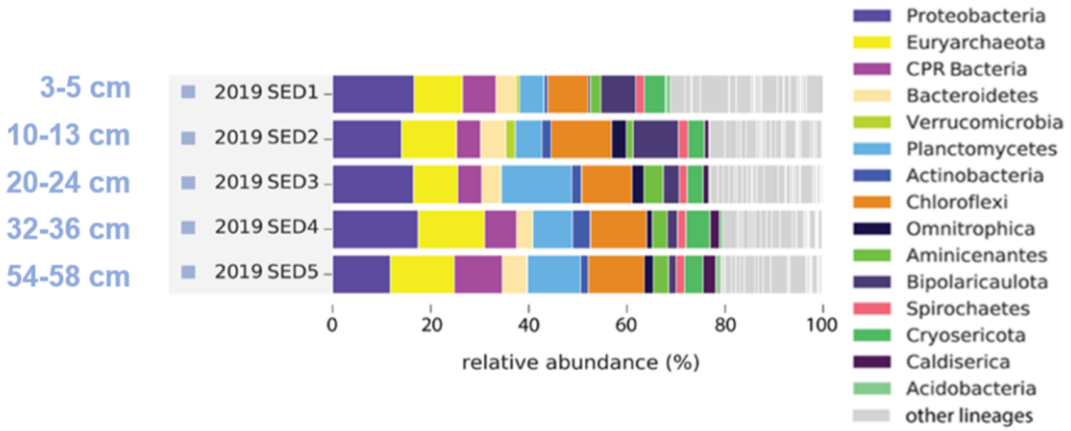


Figure 53 : **Composition des communautés microbiennes au niveau du phylum dans les sédiments du lac Pavin.** La composition taxonomique est basée sur la couverture relative des métagénomes assemblés pour les séquences protéiques codant pour le gène rpS3. Seules les 15 lignées ayant l'abondance médiane la plus élevée sont représentées, toutes les autres étant indiquées en gris ("other lineages"). Abréviations : CPR, Candidate Phyla Radiation ; SED, sédiment. Jaffe *et al.* 2023.

Méthodologies

1. Stratégie expérimentale de la thèse

Pour rappel, ce travail de thèse vise à caractériser une partie de la diversité des MTB formant des carbonates, leur biologie, leur niche écologique et d'en comprendre quelques éléments sur l'histoire de leur diversification. D'après Monteil et al., (2021), ces MTB semblent particulièrement abondantes dans les sédiments et la colonne d'eau du lac Pavin. D'autre part, le lac Pavin est un lac chimiquement stratifié dont le fonctionnement global est extensivement étudié depuis des dizaines d'années, autant d'un point de vue géochimique que microbiologique. C'est pourquoi nous avons choisi ce laboratoire naturel comme site principal d'étude (cf. Chapitre I), même si la diversité de iACCMTB a également été explorée dans d'autres environnements aquatiques (cf. Chapitre III).

La première partie de cette section présente toute l'approche mise en place pour l'étude des bactéries magnétotactiques : de l'échantillonnage à la manipulation de cellules uniques. Je présente ensuite toutes les méthodologies choisies pour la caractérisation de ces organismes et biominéraux. Etant donné qu'il n'existe pas à ce jour de modèle en culture, les populations de iACCMTB ont été étudiées par une combinaison d'approches indépendantes de la culture à l'échelle de la cellule unique et à l'échelle des populations. La physiologie de ces organismes a donc été inférée à partir de leur génome en prenant en compte leur niche écologique (cf. Chapitre III).

Ces étapes de caractérisation ont été présentées et regroupées par tâches dans le *workflow* présenté en **Figure 54**. Par ailleurs, le développement d'un modèle en culture pouvant considérablement augmenter notre compréhension de la genèse et du rôle adaptatif des inclusions de carbonate, des caractérisations ultrastructurales des bactéries cultivées les plus proches de certaines iACCMTB ont été réalisées afin de tester l'hypothèse de la formation de carbonate dans les groupes contenant des iACCMTB. La méthodologie associée à ces objectifs est décrite dans le dernier Chapitre IV.

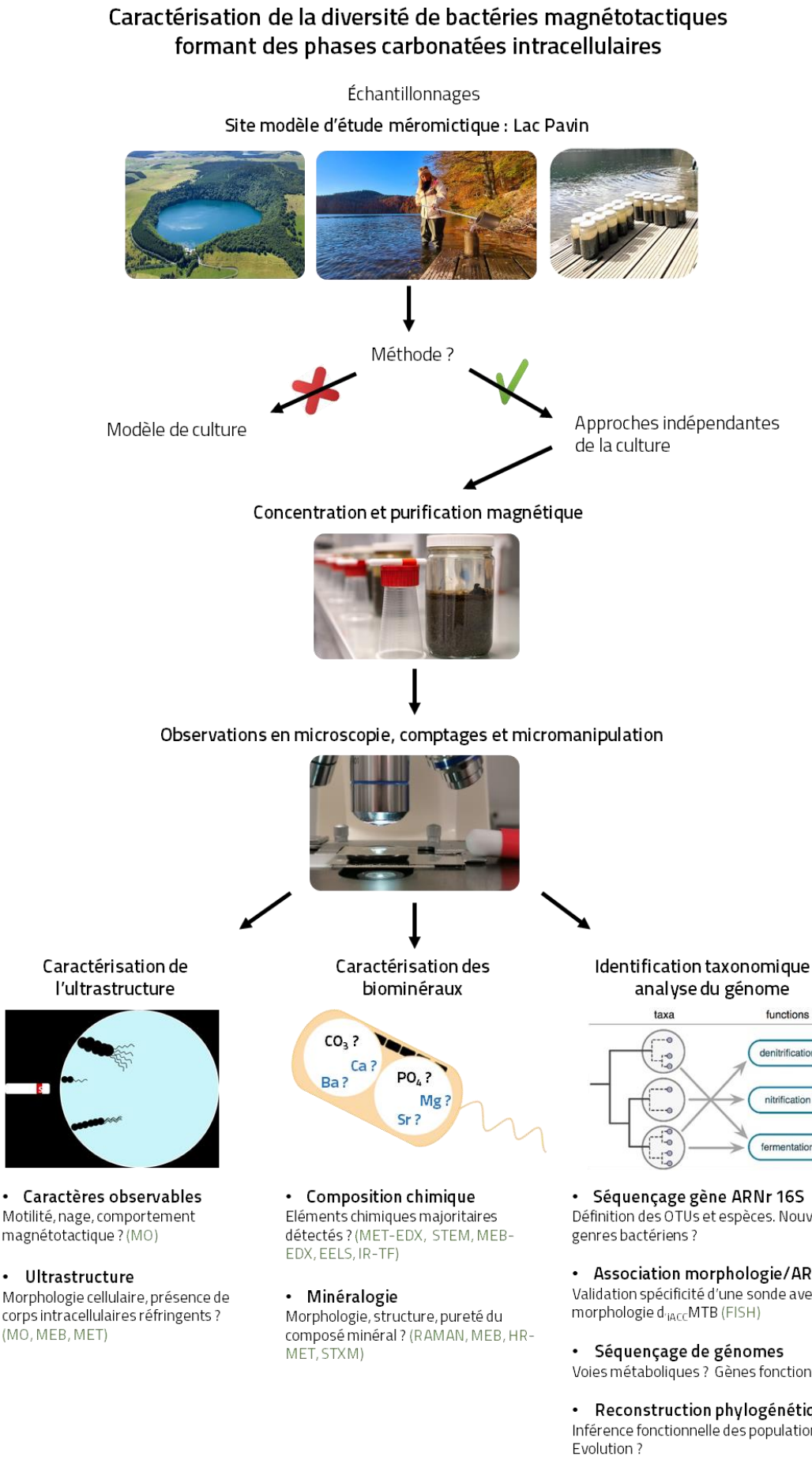


Figure 54 : Stratégie méthodologique pour la caractérisation de la diversité des bactéries magnétotactiques (MTB) formant des phases carbonatées intracellulaires.

2. Echantillonnage des sédiments et de la colonne d'eau du lac Pavin

Cette partie présente toutes les approches méthodologiques habituellement utilisées au laboratoire BEAMM pour l'étude des microorganismes magnétotactiques. Etant donné que les MTB aiment les zones de gradients chimiques, on va les retrouver à l'interface oxique-anoxique à la fois au niveau de l'interface eau-sédiments, mais également dans la colonne d'eau. Ainsi, l'étude des MTB requiert des techniques d'échantillonnage bien spécifiques et adaptées à ces zones. La majorité des échantillonnages et de l'étude de la diversité a été réalisée dans les sédiments, et l'étude des liens avec la géochimie a été principalement développée dans la colonne d'eau. Durant ma thèse, j'ai participé à 8 campagnes d'échantillonnage correspondant respectivement aux missions suivantes : **Mx65** (17-20 Mai 2021), **Mx66** (12-16 Juillet 2021), **Mx67** (26-29 Octobre 2021) et **Mx68** (11-15 Avril 2022), **Mx70** (18-29 Juillet 2022), **Mx71** (7-11 Novembre 2022), **Mx72** (13-14 Mars 2023), **Mx73** (17-20 Juillet 2023). Durant ces missions, je me suis intéressée essentiellement au sédiment, mais j'ai également participé dans une moindre mesure à l'échantillonnage et les analyses de la colonne d'eau.

2.1. Echantillonnage des MTB dans les sédiments du lac Pavin et analyses géochimiques associées

Bien qu'ils soient identifiés au niveau de la colonne d'eau, les facteurs qui contrôlent l'abondance et la structure des populations des $_{iACC}$MTB dans les sédiments du lac sont peu connus. Au niveau des sédiments, les MTB sont généralement connues pour nicher dans les 5 premiers centimètres après l'interface eau-sédiments. Leur échantillonnage a varié en fonction de la profondeur des sédiments récoltés lors de certaines missions et certains objectifs. Pour des raisons pratiques, les sédiments du bord ont été sélectionnés pour les échantillonnages des MTB, compte tenu des observations de Monteil *et al.* soulignant une importante abondance d'$_{iACC}$MTB (Monteil et al., 2021). Si les sédiments sont accessibles et peu profonds, le prélèvement des MTB nécessite simplement un système de récupération classique de sédiments (e.g. canne de prélèvement ou prélèvement direct en plongée). En surface, la nature sablonneuse du sédiment peu profond, voir la présence de roches, ne permet pas de prélever des gros échantillons avec un carottier.

En revanche, une autre profondeur a été sélectionnée sur la base d'aspects structuraux : les sédiments vaseux situés à 20 m de profondeur sont plus adaptés au carottage et donc à l'étude des gradients chimiques et microbiens. Pour ces profondeurs, il existe des systèmes de carottage de sédiments, permettant par la même occasion de conserver la stratification verticale des couches de sédiments, ce qui peut s'avérer utile dans les études de distribution de populations de MTB en fonction de la profondeur des sédiments et d'établir des niches biogéochimiques.

L'étude des sédiments est donc sectionnée en deux parties : (i) échantillonnage des iACCMTB au niveau des sédiments du bord pour la caractérisation de la diversité, (ii) échantillonnage des iACCMTB dans des carottes de sédiments profonds afin d'essayer dans un premier temps de structurer les populations de MTB avec des paramètres physico-chimiques et dans un second temps de comparer la diversité des iACCB avec les sédiments du bord.

2.1.1. Echantillonnage des sédiments peu profonds du lac Pavin

Les échantillons de sédiments du bord (20 cm à 1 m de profondeur) sont prélevés sur la rive du lac Pavin à l'aide d'une canne de prélèvement (**Figure 55**) : 400-500 mL de sédiments ont été prélevés et déposés dans des bouteilles en verre de 1 L, les 500-600 mL restant ont été complétés avec de l'eau recouvrant les sédiments. Une fois les bulles d'air exclues, les bouteilles ont été fermées avec leur couvercle. Les échantillons de sédiments ou mésocosmes ont été conservés à température ambiante (22°C) sur la paillasse.

De nombreux échantillons ont été collectés lors de ces missions : approximativement 200 échantillons de sédiments (200 mésocosmes de 1 L) à plusieurs localisations (**Figure 56**).



Figure 55 : Photographie montrant le prélèvement des échantillons de sédiments peu profonds du lac Pavin lors de la campagne Mx67.

Il est à noter que j'ai passé du temps à prospecter différents sites de prélèvement. La stratégie d'échantillonnage a été de réaliser des prélèvements aux endroits facilement accessibles du lac (i.e. sédiments peu profonds et sur le pourtour de la rive) afin de déterminer les sites où les iACCMTB sont les plus abondantes. De plus, j'ai sélectionné des sites présentant des caractéristiques environnementales (e.g. profondeur, présence d'algues, type de sédiment) assez différentes les unes des autres afin de vérifier la variabilité saisonnière ou non des populations bactériennes présentes dans ces échantillons. Ainsi, après avoir prospecté les différents sites accessibles autour du lac,

quatre sites de prélèvement (**LP1**, **LP2**, **LP3**, **LP4**) ont été sélectionnés sur la base de plusieurs critères.

Les sédiments du site **LP1** (acronyme pour « Lac Pavin n°1 ») sont les plus accessibles et étudiés ; les sédiments sont meubles, composés de graviers et de sable fin et contiennent une grande biodiversité de MTB quelle que soit la saison du prélèvement (**Figure 56C**). Le site **LP2** est un endroit totalement abrité par des arbres feuillus, moins exposé à la lumière et semble tapissé de matières en décomposition, donc vraisemblablement plus riche en matières organiques (e.g. feuilles mortes, algues, plantes), et les sédiments meubles sont plus vaseux (**Figure 56C**). Le site **LP3**, assez éloigné du passage des touristes, est représenté par des sédiments meubles sableux avec beaucoup de matières organiques et des morceaux de bois immergés (**Figure 56C**). Le dernier site **LP4** est très exposé à l'activité touristique (i.e. activité nautique, restaurant à quelques mètres, et point de vue pour la photographie). Il a été sélectionné pour sa position (entre le LP1 et LP2) mais surtout par l'aspect des sédiments granuleux, semblables à du gravier de couleur beige-rose (**Figure 56C**).

Les quatre sites ont été utilisés pour toutes les étapes de caractérisation des populations de $_{iACC}$MTB, à l'exception des calculs d'abondances où seulement les sites **LP1**, **LP2** et **LP3** ont été sélectionnés (cf. partie 3.2). En effet, la diversité des morphotypes de $_{iACC}$MTB n'était pas systématiquement observable dans tous les échantillons du site **LP4**, ni à toutes les saisons.

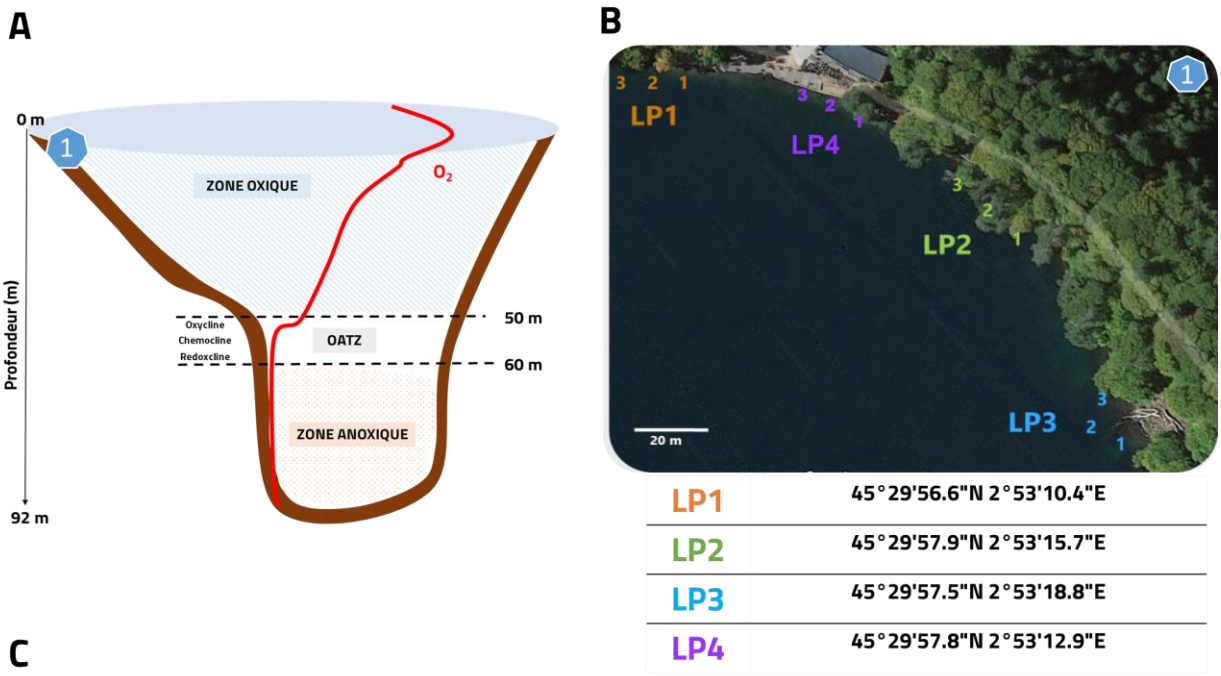


Figure 56 : A) Représentation schématique du lac Pavin et des sites d'échantillonnage sélectionnés dont la localisation est représentée par le chiffre 1 (bleu). B) Cette localisation comprend les sédiments peu profonds du pourtour de la rive et 4 sites de prélèvement ont été sélectionnés : LP1, LP2, LP3, LP4. Les coordonnées GPS ont été relevées pour chacun des sites. C) Photographie des échantillons récoltés dans les pots de 1 L montrant les différents aspects des sédiments dans chaque site de prélèvement. Acronymes : LP (lac Pavin), OATZ (zone de transition oxique-anoxique).

2.1.2. Echantillonnage des sédiments profonds du lac Pavin

Des échantillonnages de MTB ont également été effectués lors de carottages de sédiments profonds de 20 ± 2 m. La sélection de cette profondeur est due à la stabilité structurelle des sédiments, qui nous a permis d'extraire des carottes intactes avec des gradients chimiques et microbiens non perturbés. Les prélèvements ont été réalisés avec un carottier UWITEC permettant de faire des carottes de 50 cm. Ces carottes sont prélevées et découpées en anaérobie en sections de 1 cm d'épaisseur (**Figure 57**). Afin de conserver l'anoxie, plusieurs carottes sont prélevées de manière à garantir au minimum une carotte de sédiment spécifique à chaque analyse (i.e. chimique, microbiologique, ou biogéochimique) ; les différentes analyses ne pouvant pas être réalisées sur une même carotte. Une fois les prélèvements effectués, les carottes sont transportées au laboratoire

de Besse-et-Saint-Anastaise pour les analyses. Une fois découpées, les différentes couches des carottes ont ensuite été transportées au BIAM et maintenus à 4°C pour plusieurs mois.

2.1.3. Analyse géochimique de l'eau interstitielle et des sédiments

L'étude de la géochimie de l'eau interstitielle et des sédiments a été réalisée essentiellement par Neha Mehta et Eric Viollier à partir des carottes de sédiments collectées à 20 m ± 2 m de profondeur (**Figure 57**).



Figure 57 : **Photographies montrant l'échantillonnage des échantillons de MTB dans les sédiments profonds (20 m) avec un carottier UWITEC et le découpage de tranches (1 cm) de sédiments en anoxie (dans un sac à gants) effectué par l'équipe de géochimistes de l'IMPMC et l'IPGP.**

Les carottes mesurant 30 cm de hauteur et 10 cm de diamètre ont été sectionnées en tranches de 1 cm d'épaisseur en anaérobiose dans un sac à gants (**Figure 57**). Un oxygénomètre a été utilisé pour mesurer l'oxygène dans le sac à gants. L'oxygénomètre indiquait 0 à 0,1 % durant les découpages. Dans le sac à gants, l'eau interstitielle de chaque tranche de sédiment est extraite à l'aide de RHIZON (i.e. micro-préleveur de solutions du sol en polymère poreux, RHIZON CSS 8 cm). L'eau interstitielle et l'eau de surface de chaque tranche ont été analysées pour réaliser des mesures de DIC, de pH, de potentiel d'oxydoréduction, de H_2S et des principaux anions et cations (décrits ci-dessous). Les sédiments sont transportés au laboratoire dans des feuilles aluminium (Protpack, UK) permettant leur conservation. Les profils d'oxygène dissous sont mesurés dans les sédiments à l'aide d'un oxymètre avec une sonde en fibre optique (diamètre de l'extrémité de 50 µm, OXR50) et d'un compteur FireStingO_2, de la marque Pyroscience (**Figure 58**). Des profils à haute résolution (pas de 100 µm, de 10 mm au-dessus du sédiment à -25 mm sous le sédiment) ont été réalisés avec un micromanipulateur motorisé MU1 de Pyroscience. L'étalonnage des capteurs a été réalisé par rapport à l'air saturé (O_2 sat.=100%) et une solution d'eau dégazée à l'azote N_2.

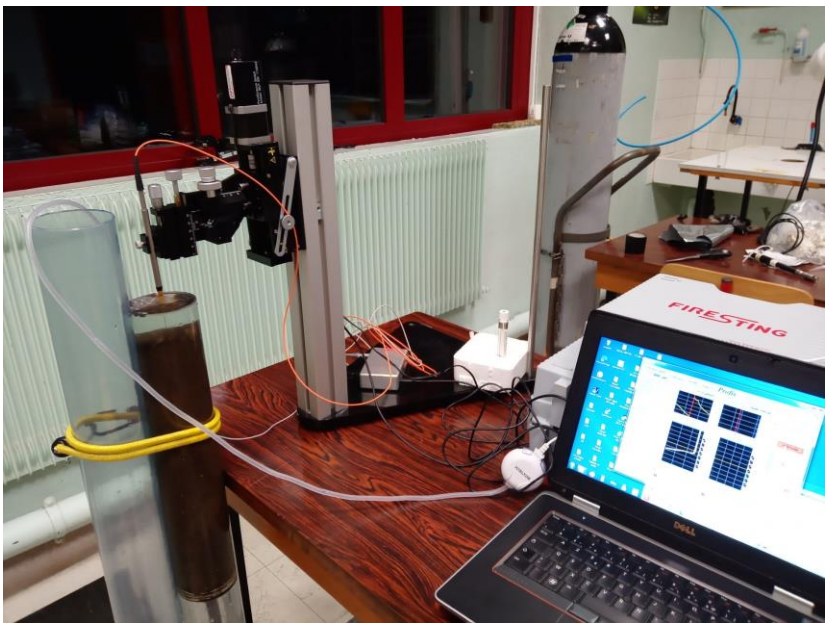


Figure 58 : **Photographie montrant les mesures d'oxygène dissous dans les carottes de sédiments à l'aide d'une sonde en fibre optique OXR50, d'un compteur FireStingO_2 couplé à un micromanipulateur motorisé MU1 (Pyroscience)**

Les échantillons d'eau interstitielle et d'eau de surface ont été préparés pour différentes analyses géochimiques dans le sac à gants. Pour la mesure des principaux cations (Ca, Ba, Sr, Fe, Mn, K, Si, P, S), les échantillons ont été acidifiés à l'aide de HNO_3 à 70 % (wt) avant d'être analysés par spectroscopie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES). Pour la mesure du H_2S, les échantillons ont été complétés avec de l'acétate de zinc et le H_2S est mesuré à l'aide d'une méthode colorimétrique développée par Cline J.D (Cline, 1969). Pour l'analyse des anions majeurs, les échantillons ont d'abord été complétés par de l'acétate de zinc pour piéger le H_2S dissous, puis analysés par chromatographie ionique avec un chromatographe Dionex (erreur conventionnellement acceptée de ± 5%) pour le sulfate, le fluorure, le chlorure, le bromure, le nitrate et le phosphate. Les mesures de DIC ont été effectuées à l'aide d'un analyseur de carbone total (Shimadzu TOC analyzer).

Pour l'analyse des sédiments, les échantillons de sédiments humides ont été entièrement séchés dans un dessiccateur sous vide. La minéralogie des tranches de sédiments a ensuite été analysée à l'aide d'un diffractomètre à rayons X pour poudres Panalytical, équipé d'une source de rayons X à co-anode. Les diagrammes ont été enregistrés entre 2theta = 3-70°, avec des pas de 0,001° et 2 ms/pas. Les diagrammes XRD ont été analysés à l'aide du logiciel HighScore Plus ™, méthode qui implique la soustraction de l'arrière-plan, l'identification et l'attribution des pics. L'intégralité des étapes d'analyse pour les échantillons XRD ne sont pas décrites ici, car elles ont été réalisées par notre équipe collaboratrice, notamment par Neha Mehta.

Un aliquot du sédiment humide de chaque tranche a été déposé sur un filtre en polyéthersulfone (PES) de 0,22 µm. Les filtres ont été séchés à température ambiante et

montés sur des supports en aluminium à l'aide d'un ruban adhésif double face en carbone. Les échantillons ont été recouverts de carbone avant d'être analysés au MEB. Les observations au MEB ont été effectuées à l'aide d'un MEB Zeiss Ultra55 à l'IMPMC. La tension d'accélération des électrons utilisée est de 10 ou 15 kV avec une distance de travail de 7,5 mm et une ouverture de 60 µm. Les images sont collectées avec un détecteur d'électrons rétrodiffusés (détecteur AsB) et les cartes des différents éléments (Ca, P, K, Mg, Si, Fe) sont extraites des données hyperspectrales (HyperMap) de la spectrométrie des rayons X à dispersion d'énergie (EDXS).

2.2. Echantillonnage des MTB dans la colonne d'eau du lac Pavin et analyses géochimiques associées

2.2.1. Echantillonnage des MTB de la colonne d'eau

Les échantillons de la colonne d'eau ont été prélevés juste en dessous l'OATZ à des profondeurs comprises entre 45 et 65 m depuis une plateforme située près du centre du lac Pavin (45.495792°N, 2,888117°E) (**Figure 59**). Différentes techniques peuvent être utilisées pour le prélèvement d'eau en profondeur. Lors des premières missions, les échantillons étaient prélevés avec une bouteille Niskin. Depuis l'étude comparative réalisée par Busigny *et al*. (Busigny et al., 2021) une technique d'échantillonnage avec une résolution verticale de 10 cm est utilisée. Cette technique permet de réaliser des prélèvements plus rapidement grâce à un système de pompage en ligne avec un tuyau immergé sur toute la colonne d'eau du lac. Au cours de cette thèse, nous avons ainsi utilisé cette technique permettant de collecter l'eau à une profondeur précise avec un système de pompage permettant d'augmenter la vitesse d'échantillonnage (Busigny et al., 2021).

Les bactéries d'intérêt recueillies dans la colonne d'eau n'ont pu être conservées que quelques jours lorsqu'elles étaient stockées à 4°C, car ce type de mésocosme ne conserve pas les conditions *in situ* avec la disparition des gradients après prélèvement. Pour les analyses de microscopie et d'identification des communautés microbiennes, l'eau à différentes profondeurs était récupérée en sortie de tuyau, en faisant le plus attention possible de ne pas trop oxygéner l'eau lors du remplissage de bouteilles de 1 L à leur capacité maximale.

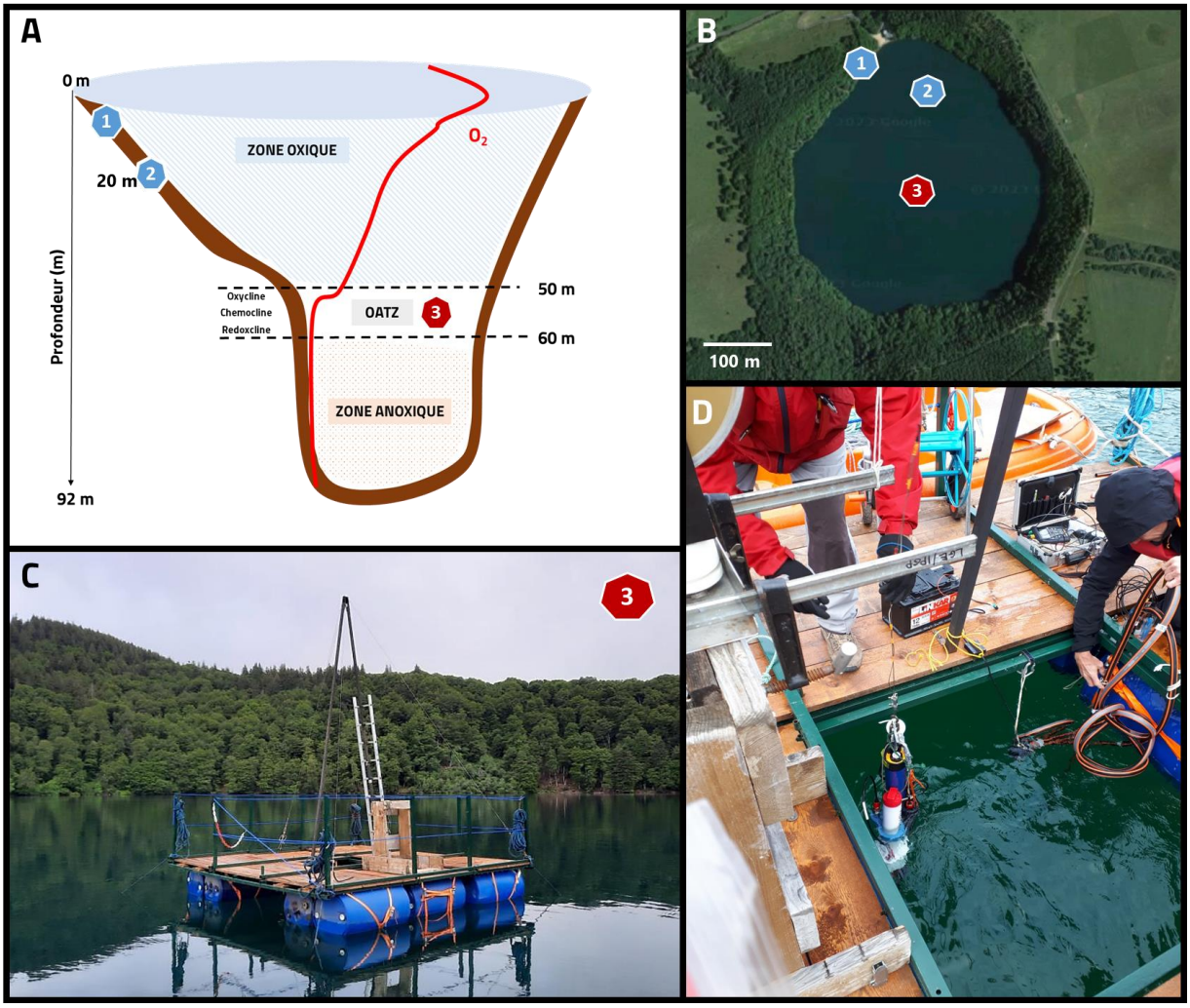


Figure 59 : **Collecte des échantillons de MTB dans la colonne d'eau du lac Pavin**. A) Représentation schématique des sites d'échantillonnage de MTB au lac Pavin représentés par des numéros colorés en bleu pour les sédiments (1 et 2) et rouge pour la colonne d'eau (3). B) Photographie en vue aérienne (*crédit : Google Maps*) du lac Pavin et des sites d'échantillonnage (1,2 et 3). C) Photographie de la plateforme située au centre du lac Pavin où sont réalisés les prélèvements de la colonne d'eau. D) Prélèvement de la colonne d'eau *via* un système de pompage en ligne avec un tuyau immergé sur toute la colonne d'eau du lac.

2.2.2. Analyse géochimique de la colonne d'eau

Le lac Pavin est un site particulièrement propice au développement de iACCMTB et de MTB plus généralement (Busigny et al., 2021; Monteil et al., 2021), pour lequel un suivi de la géochimie et de la microbiologie est réalisée de manière saisonnière depuis 2017 par un consortium de scientifiques de l'IMPMC, l'IPGP et le BIAM dans l'objectif d'identifier des conditions physicochimiques associées à la présence des MTB. Dans la continuité de ce travail et tel que décrit dans Monteil *et al.* (2021), nous avons mesuré *in situ* un certain nombre de paramètres physicochimiques dans la colonne d'eau du lac Pavin lors de plusieurs missions (**Mx64** à **Mx71** entre 2019 et 2022), qui ont été corrélés avec l'abondance et la distribution des populations de iACCMTB en utilisant des équipements similaires à ceux utilisés lors d'une étude sur les communautés de MTB hyperaccumulant des granules de polyphosphates (Bidaud et al., 2021).

Lors de chaque mission, les deux premiers jours sont consacrés au profilage géochimique *in situ* de la colonne d'eau afin de localiser les MTB et l'oxycline. Un premier profil de la concentration en MTB, O_2 et de la conductivité, est effectué pour localiser le maximum d'abondance de MTB avant de réaliser un second profil, plus fin et résolutif, autour du pic d'abondance. Ces paramètres ont été mesurés car le maximum d'abondance des MTB est systématiquement détecté : (i) sous la limite de détection d'O_2 dans une gamme spécifique de conductivité, (ii) proche de la décroissance maximale du potentiel redox et du pic de turbidité, et (iii) à une profondeur moins importante en automne par rapport à l'été (Busigny et al., 2021). De plus, la transition entre le mixolimnion et le monimolimnion est souvent caractérisée par de forts gradients chimiques. Une fois le pic d'abondance de MTB et l'oxycline identifiés, différentes analyses géochimiques sont réalisées par les partenaires de l'IMPMC et l'IPGP à Paris.

L'oxygène dissous, la conductivité et le potentiel d'oxydoréduction (ORP) sont mesurés *in situ* à l'aide d'une sonde CTD YSI EXO2. Outre les mesures d'O_2 dissous, d'ORP et de conductivité, d'autres paramètres physicochimiques sont mesurés *in situ* à l'aide de la sonde CTD multi-paramètres YSI EXO2, tels que la température, le pH, la turbidité, la concentration en matière organique dissoute fluorescente (fDOM) et la concentration en chlorophylle. La limite de détection de l'O_2 dissous est d'environ 0,1 % ou environ 0,3 ± 0,2 µM. La turbidité est également mesurée simultanément *in situ* avec une sonde Aquatec AQUAlogger 210TYPT (capteur de turbidité Seapoint, 880 nm) pour obtenir un seuil de sensibilité plus faible. Un capteur d'oxygène est étalonné par rapport à l'air ambiant saturé en vapeur d'eau (saturation locale en O_2 de 100 %), et la saturation en O_2 "zéro" est vérifiée à l'aide d'une solution de sulfite de sodium à 10 % w/v. La conductivité spécifique à 25 °C est étalonnée par rapport à une solution standard de KCl (1 413 µS cm^{-1}) et le pH à l'aide de 3 tampons (4/7/10). Les différentes sondes sont fixées à l'extrémité du tuyau de prélèvement afin d'avoir un suivi en direct de ces paramètres durant les prélèvements.

Pour les analyses chimiques, les solutions contenues dans les bouteilles d'échantillonnage sont filtrées à 0,22 µm avant les analyses. Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre CyberScan pH 5500 (Eutech instruments) et d'une microélectrode pH combinée (Fisherbrand) calibrée avec des solutions tampons standard Hanna pH de Hanna (4.010, 7.010, 10.010). L'incertitude pour cette mesure est de 0,01 unité de pH. Les analyses élémentaires de [Ca^{2+}] ont été effectuées sur des échantillons acidifiés avec HNO_3 (2%) par ICP-AES (iCAP6200 Thermofisher) avec une incertitude de 0.7%. Toutes les mesures étaient largement supérieures au seuil limite de détection (environ 0,1 ppb).

Pour chaque échantillon d'eau, une partie de la solution filtrée est complétée avec de l'acétate de zinc afin de précipiter la concentration de ΣH_2S à l'état de traces et utilisée pour la mesure du sulfate et d'autres anions (fluorure, chlorure, bromure, nitrate) par chromatographie ionique avec un chromatographe Dionex (erreur conventionnellement

acceptée de ±5%). Ce protocole permet d'éviter certains artefacts sur la détermination du SO_4^{2-} dû à la réoxydation des sulfures s'ils sont présents dans l'eau.

3. Concentration et purification des organismes magnétotactiques

L'avantage d'étudier les MTB est qu'il est possible de les observer même si elles sont présentes en faible concentration dans leur milieu naturel. Leurs magnétosomes et leur magnétotactisme permet de les purifier simplement en plaçant un aimant contre la partie supérieure de la bouteille contenant l'eau et les sédiments prélevés. Le temps de concentration optimal a été choisi en fonction des observations antérieures et dépend principalement de la vitesse de nage des populations de MTB, de leur sensibilité à l'aimant utilisé et à leur polarité magnétique. Une fois les cellules agrégées contre la paroi du microcosme, elles sont prélevées avec une micropipette. Soit les MTB sont purifiées par la méthode « *capillary race track* » (Wolfe et al., 1987), soit elles sont isolées par des approches de « *single-cell* » (Kolinko et al., 2012), ceci permettant l'étude de leur morphologie, physiologie et taxonomie ou d'essais de culture. Une fois la cellule triée et isolée, des étapes d'amplification du génome entier et des analyses ultrastructurales ont aussi été réalisées.

3.1. Enrichissement magnétique et observations en microscopie optique

La première étape de l'enrichissement magnétique consiste à casser les gradients physico-chimiques présents dans le mésocosme en mixant les sédiments avec l'eau de surface des bouteilles d'échantillonnage. Après 5 minutes, temps nécessaire à la chute des grosses particules de sédiment, les MTB recherchant le Nord géographique ont été concentrées en plaçant le pôle sud d'un barreau aimanté pendant 2 à 3 heures à côté des bouteilles échantillonnées, au-dessus de l'interface sédiment-eau (**Figure 60A**).

Le lac Pavin étant situé dans l'hémisphère nord, la majorité des MTB devraient donc être attirées par le pôle sud de l'aimant. Les barreaux aimantés cylindriques utilisés ont une intensité magnétique de 10 mT. Afin de pouvoir les observer rapidement, la technique la plus simple et utilisée est la méthode de la « goutte suspendue » (**Figure 60B**). Cette méthode consiste à déposer une goutte de MTB concentrées magnétiquement, entre une lame et lamelle séparées par un séparateur en caoutchouc (i.e. joint torique dans notre cas). Un aimant est placé sur un bord de ce dispositif permettant l'agrégation des MTB au bord de la goutte. L'observation des cellules magnétiquement concentrées a été réalisée sous un microscope optique droit Zeiss Primo Star équipé d'optiques à contraste de phase et à contraste interférentiel différentiel. Ainsi, il a été possible de distinguer les différentes morphologies, les comportements magnétotactiques en utilisant des objectifs de 10, 20, 40, 63 ou 100.

La magnétotaxie est mise en évidence en faisant tourner un barreau aimanté à 180° sur la platine du microscope pour inverser le champ magnétique local. La motilité et le comportement magnétotactique sont observés et enregistrés à l'aide d'une caméra Axiocam 105 Zeiss, le traitement des images et vidéos a été réalisé avec le logiciel Zen. Les inclusions de carbonate des cellules d'intérêt ($_{iACC}$MTB) ont la particularité d'être réfringentes avec la lumière du microscope optique (MO) (**Figure 60C**). Cette capacité à former des inclusions de $CaCO_3$ apparaissant très « brillantes », nous a permis de les repérer, de distinguer les différents morphotypes et de suivre leur nage dans la goutte suspendue. Ainsi, il a été possible de rapidement appréhender sous le MO l'importante diversité de ces bactéries et l'existence de plusieurs morphotypes portant des iACC réfringents visibles qu'on nommera « morphotype X », ce dernier étant l'acronyme donné pour qualifier les morphotypes de bactéries magnétotactiques productrices de carbonates de calcium. Un numéro de morphotype a été donné à chaque fois qu'une nouvelle $_{iACC}$MTB est découverte, sur la base de critères décrits plus loin.

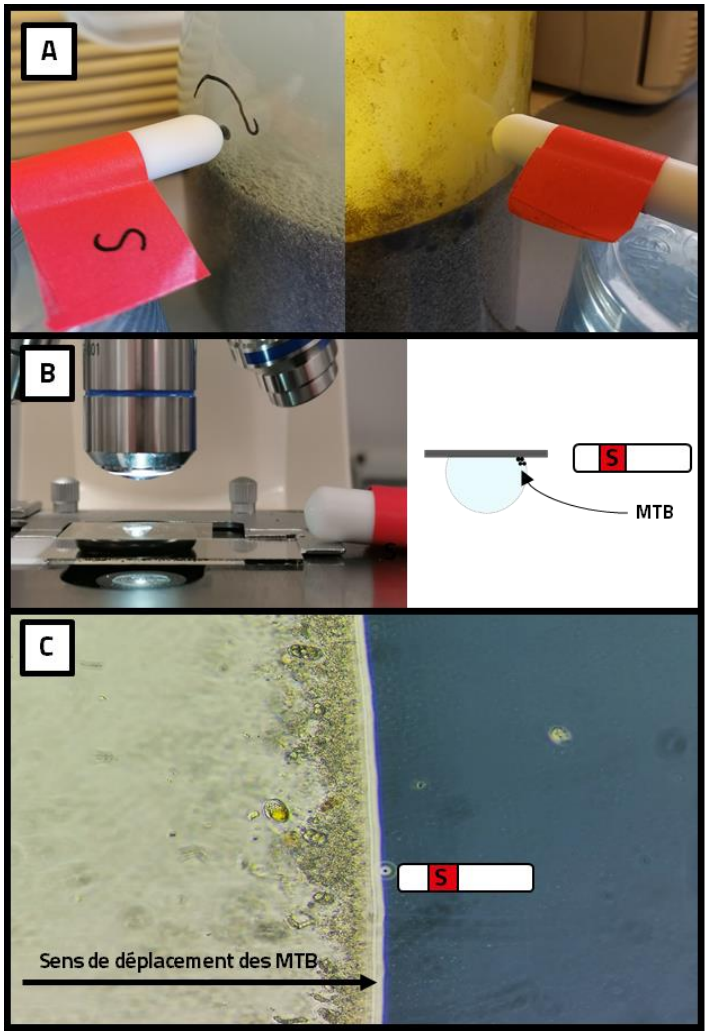


Figure 60 : A) Photographies de culots de MTB recherchant le Nord géographique concentrées en plaçant le pôle sud d'un barreau aimanté pendant 2 à 3 heures à côté des bouteilles échantillonnées, au-dessus de l'interface sédiment-eau. B) Photographie et représentation schématique de la technique de la goutte suspendue permettant d'observer les MTB. C) Image de microscopie optique montrant le sens de déplacement des MTB vers le sud de l'aimant.

3.2. Quantification des populations de MTB dans les sédiments

3.2.1. Comptage des cellules de MTB dans les sédiments peu profonds

Dans le but d'estimer leur abondance dans les sédiments peu profonds, les cellules triées magnétiquement des sites de prélèvement **LP1**, **LP2**, **LP3** ont été comptées pendant les observations en microscopie optique, lors de la mission **Mx70**. Pour ce faire, les MTB doivent être récoltées à partir d'un volume connu de sédiments afin d'assurer la reproductibilité et pour obtenir un nombre de cellules par volume de sédiments. Nous avons choisi d'utiliser une seringue de 50 mL dont le bout est coupé pour prélever une hauteur constante (i.e. petite carotte de 4 cm) de sédiment. De cette façon, nous avons récolté un volume connu de 21 cm^3 de sédiment (**Figure 61A**). Afin de prélever un volume suffisant de sédiment, nous avons déterminé une stratégie : enfoncer la seringue progressivement dans les sédiments tout en faisant des mouvements de rotation et en tirant le piston ; l'excès de sédiments prélevé (> 4 cm de profondeur) a été rejeté (**Figure 61B**). Les sédiments ont ainsi été récoltés pour chaque site de prélèvement **LP1**, **LP2**, **LP3** en triplicata. La petite carotte est ensuite transférée de la seringue vers un tube Falcon de 50 mL et complétés par de l'eau de surface du site échantillonné préalablement filtrée à 0.22 µm. Le même protocole de tri magnétique a ensuite été appliqué (cf. section précédente 3.1) à l'exception qu'un petit aimant en néodyme fer-bore a été scotché à la surface des tube Falcon afin de facilité le maintien de l'aimant pendant la concentration. Après 2h de tri magnétique, 100 µL du culot bactérien situé contre l'aimant ont été récoltés et transférés dans un tube Eppendorf. Les cellules ont été homogénéisées avec des mouvements d'aller-retour avec une micropipette. 50 µL de ce tube ont ensuite été prélevés et transférés sur une lamelle de microscopie et observés sous le MO en utilisant la technique de la goutte suspendue. 10 minutes d'attente sont nécessaires pour que les cellules migrent vers le bord de la goutte et ainsi permettre leur comptage.

Trois concentrations magnétiques successives et donc trois comptages successifs ont été réalisés à partir d'un même tube de manière à estimer le facteur d'épuisement de chaque population de MTB entre chaque concentration magnétique. En utilisant cette approche, il a été possible d'obtenir (i) une concentration cellulaire (cellules / mL) et (ii) une estimation du nombre total de chaque population de cellules contenues dans le tube Falcon. Afin d'obtenir l'abondance relative de certaines MTB aux morphologies variées par rapport aux autres, le nombre de cellules de MTB comptées est ensuite converti en fréquence relative :

$$Fréquence\ relative : \frac{Nombre\ total\ de\ MTB\ morphologie\ 1}{Somme\ totale\ des\ MTB\ toute\ morphologie\ confondue}$$

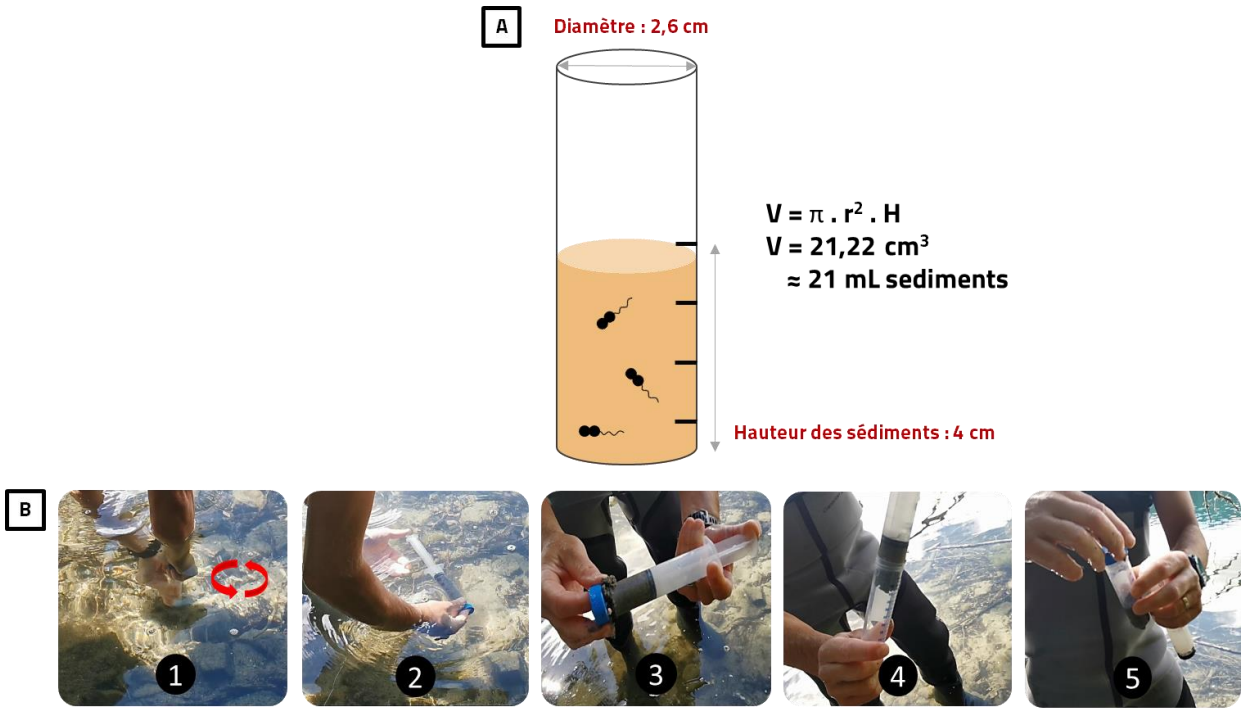


Figure 61 : **Stratégie d'échantillonnage pour les calculs d'abondance de MTB dans les sédiments peu profonds.** A) Représentation schématique d'un cylindre représentant notre système de prélèvement de sédiment (i.e. seringue coupée). La formule mathématique permettant le calcul d'un volume connu de sédiments prélevés est indiqué (21 cm^3). B) Photographies des 5 étapes de prélèvement (numérotées de 1 à 5) afin d'obtenir 21 cm^3 de sédiments.

3.2.2. Comptage des cellules de MTB dans les carottes de sédiment profond (20 m)

Afin d'établir s'il y a une structure des populations selon la profondeur, les cellules de MTB triées magnétiquement de chaque tranche de sédiment profond ont été comptées lors des observations en microscopie optique pendant la mission **Mx71**. Les tranches de sédiment ont été découpées tous les 1 cm dans des conditions anoxiques (**Figure 62A**). Chaque tranche dédiée à ces comptages est transférée dans un tube Falcon de 50 mL puis complétée avec de l'eau de surface du lac Pavin préalablement filtrée à 0.22 µm (**Figure 62B**). Les tranches de sédiment ont été découpées jusqu'à une profondeur de 10 cm. Chaque profondeur possédant un triplicata d'échantillons, 30 tubes de sédiment profond ont été collectés et destinés pour les comptages cellulaires. Le même protocole de tri magnétique et de comptage que celui du sédiment peu profond ont été appliqués. A partir de la tranche 6 (i.e. 6 cm sous l'interface eau-sédiment), un seul comptage a été effectué car les populations de MTB étaient les mêmes que la tranche 5 et nous avons constaté que le facteur d'épuisement entre chaque concentration magnétique successives était relativement similaire. Ainsi, en réalisant une moyenne des facteurs d'épuisement des différentes populations des MTB entre les comptages successifs nous avons pu obtenir une estimation de l'abondance minimale des différentes populations de MTB dans les différentes couches de 1 cm dans les carottes profondes.



Figure 62 : **Stratégie d'échantillonnage pour les calculs d'abondance de MTB dans les sédiments profonds.** A) Photographie du découpage des tranches de1 cm de sédiment profond en condition anoxique. Les tranches sont réparties et transférées dans les tubes Falcon de 50 mL. B) Tri magnétique effectué pendant 2h sur chaque tube avant les comptages des populations de MTB.

3.3. Tri des MTB par micromanipulation

Le racetrack est très utile lorsque l'on s'intéresse aux communautés totale de MTB dans un échantillon. Toutefois, lorsqu'on s'intéresse à un type de MTB, une approche plus spécifique de tri est nécessaire. Durant ma thèse, l'exploration de la diversité des MTB d'intérêt a essentiellement été réalisée à partir de cellules triées par micromanipulation en MO. Lors de cette approche, les MTB concentrées magnétiquement ont été triées avec un micromanipulateur InjectMan® NI2 et d'un microinjecteur manuel hydraulique CellTram® vario (Eppendorf) montés sur un microscope à LED Leica DM IL (**Figure 63A**). Le microscope et le micromanipulateur sont placés à l'intérieur d'un caisson, lavé à l'éthanol 70% et stérilisés par une irradiation germicide de 2 h aux ultraviolets (longueur d'onde de la lampe : 254 nm) avant utilisation. Une goutte de 10 µL contenant des cellules magnétiquement concentrées est délicatement ajoutée à une goutte de 20 µL d'eau filtrée (0,2 µm) du lac Pavin sur une lamelle hydrophobe afin de transférer magnétiquement les cellules magnétotactiques vers l'eau filtrée propre. Les cellules sont transférées à l'aide d'un microcapillaire stérile (TransferTip® (ES) de 4 ou 15 µm de diamètre interne en fonction de la taille de la cellule d'intérêt) dans une goutte de 4 µL de solution saline tampon phosphate (PBS) (**Figure 63B**). Cette goutte est conservée à -20 °C avant la réalisation de l'amplification du génome (cf. section 4.2.1).

La micromanipulation peut être également une approche de tri cellulaire utilisée pour l'observation d'une cellule de MTB au microscopie électronique, dans des conditions non stériles. Le micromanipulateur couplé au microscope va permettre ici de trier magnétiquement une ou plusieurs cellules aux traits morphologiques souhaités et de les déposer sur une grille de MET (cf. section 4.3.1). Cette méthode s'avère utile lorsque les échantillons sont très diversifiés en populations de MTB et que l'on souhaite faire correspondre une ultrastructure ou un comportement observé au microscope optique avec une ultrastructure plus résolue au microscope électronique en transmission.

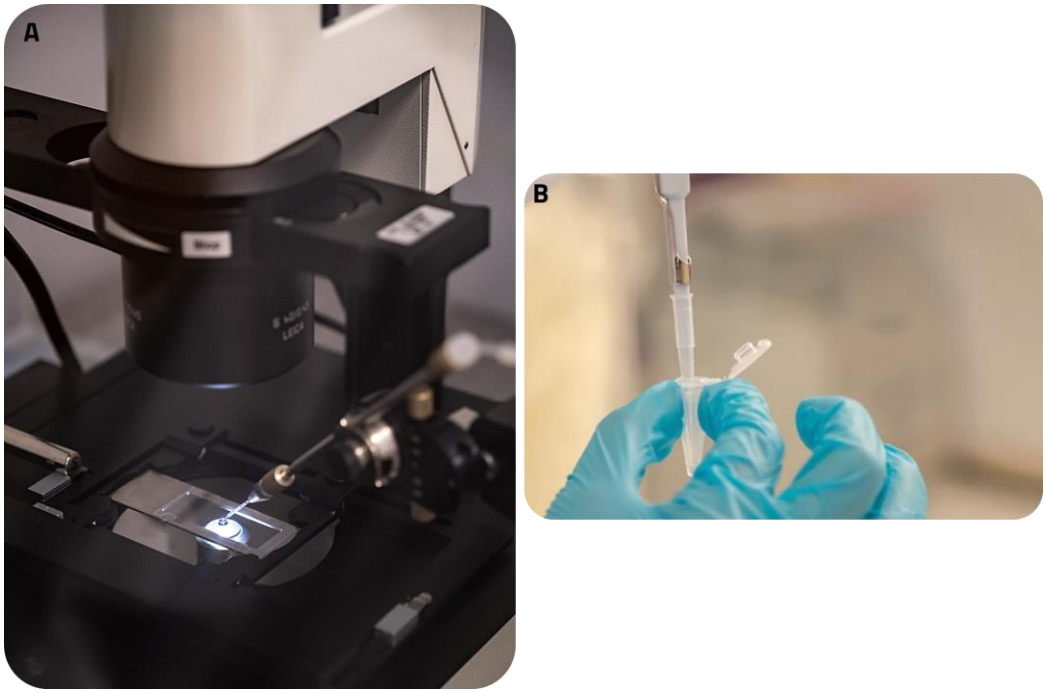


Figure 63 : **Photographies de micromanipulation de cellules de MTB au lac Pavin dans des conditions stériles**. A) Photographie montrant les cellules transférées à l'aide d'un microcapillaire stérile couplé au micromanipulateur InjectMan® NI2 et d'un microinjecteur manuel hydraulique CellTram® vario (Eppendorf). B) Récolte des cellules de MTB dans la goutte de PBS et transfert de cette goutte dans un tube Eppendorf stérile conservé à -20 °C avant la réalisation de l'amplification du génome.

4. Identification des $_{iACC}$MTB

Dans cette partie, je présente les méthodes choisies pour la caractérisation de la diversité spécifique de ces organismes.

La classification de la diversité taxonomique et fonctionnelle de ces populations en plusieurs morphotypes a été effectuée par un ensemble de métadonnées de phénotypage, de minéralogie et génotypage qui ont permis de les distinguer et de les regrouper. Ces objectifs de caractérisation et classification nécessitent à la fois (i) de maitriser les concepts de l'espèce bactérienne et les méthodes de taxonomie et de classification bactérienne, (ii) d'utiliser les méthodologies adéquates pour l'étude des microorganismes et de leurs biominéraux et enfin (iii) d'avoir une vue d'ensemble sur la diversité fonctionnelle et métabolique des procaryotes. Ces différents aspects sont donc développés dans les sections qui suivent.

4.1. Introduction à la classification actuelle et son évolution

La systématique est la science qui permet d'inventorier la diversité de tous les organismes vivants, dans un but de les classer entre eux et d'établir une classification biologique et définir une nomenclature biologique. Les paramètres et critères permettant de les classer sont nombreux et peuvent être d'origine phénotypique (caractères observables) et génomique (caractères non observables basés sur les séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés) (Marakeby et al., 2014; Prinzi and Moore, 2023).

4.1.1. Notion d'espèce chez les bactéries

La classification des organismes a permis notamment de regrouper l'arbre du vivant en plusieurs groupes, rangs taxonomiques qui sont les suivants : le domaine, l'embranchement (ou phylum), la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce. Ainsi, l'unité de base utilisée pour la classification, est l'espèce. Avec l'avènement des technologies de séquençage avancées associées à des changements fréquents d'assignation, la définition d'une espèce reste très complexe et évolue en permanence, surtout chez les microorganismes. En effet, les méthodologies de classification actuelles sont sujettes à différentes écoles et controverses, qui considèrent ces changements sous des angles différents (Prinzi and Moore, 2023), notamment les macrobiologistes (e.g. trait phénotypique), les microbiologistes cliniques (e.g. pouvoir pathogène d'un agent microbien), les microbiologistes industriels et agricoles (e.g. métabolisme à des fins biotechnologiques) et les taxonomistes (e.g. liens de parenté). Bien qu'il soit nécessaire de normaliser toutes les méthodes de classification afin de fournir un langage universel dans la communication scientifique, la dénomination d'une espèce est sujette à de nombreux débats, surtout dans le monde microbien.

Il n'existe donc pas à ce jour une définition d'espèce largement acceptée par la communauté scientifique (Marakeby et al., 2014; D. H. Parks et al., 2018). Le concept d'espèce chez les procaryotes est complexe car ces dernières peuvent transférer du matériel génétique par des mécanismes de scissiparité, mais également échanger du matériel génétique « horizontalement » par conjugaison, transduction ou transformation indépendamment de leur proximité génétique.

4.1.2. Avènement de l'ADN

L'avènement du séquençage d'ADN et les progrès techniques de la biologie moléculaire ont considérablement bouleversé les méthodes de classification biologique (Marakeby et al., 2014). En effet, grâce à l'arrivée de la technologie PCR (*réaction en chaîne par polymérase*) du gène codant l'ARNr 16S au milieu des années 70 (Woese et al., 1975), la classification phylogénétique a pu établir des homologies entre les organismes par rapport à leurs séquences d'ARNr 16S. Depuis l'avènement de séquençage à haut débit et des séquences 16S amplifiées par PCR au début des années 2000 (Mardis, 2008), il a fallu

trouver des méthodes de classification et des unités de base pour regrouper les organismes. C'est pourquoi la notion d'unité taxonomique opérationnelle (OTU) est apparue et représente une unité de base pour regrouper des individus phylogénétiquement proches. Une OTU est un groupe contenant des séquences proches du gène ARNr 16S avec une suite de nucléotides similaires (Moyer et al., 1994). Ainsi grâce à des alignements de séquences, des clusters sont formés et l'identité entre deux séquences est calculée en pourcentage. Pour les séquences du gène de l'ARNr 16S, le seuil d'identité défini pour appartenir à la même OTU est de 97% (Konstantinidis and Tiedje, 2005; Nguyen et al., 2016). Dans notre cas, nous utiliserons un seuil de similarité à 99% pour définir une OTU (cf. Chapitre I, p. 170).

L'utilisation de toutes ces techniques moléculaires dans la systématique a engendré d'autres propositions quant à la définition de l'espèce bactérienne. Les premiers critères réunis permettant de définir une espèce sont : (i) un seuil d'hybridation ADN/ADN supérieur à 70% avec un écart maximum de température d'hybridation de 5°C (Wayne et al., 1987), (ii) un pourcentage de G+C ne devant pas différer de plus de 3-5 % (Mesbah et al., 2011), (iii) un seuil d'identité de séquences du gène ARNr 16S supérieure à 97% (STACKEBRANDT and GOEBEL, 1994). Une réévaluation de ce seuil a été proposée pour des raisons pratiques afin d'éviter les étapes de vérification hybridation ADN/ADN. C'est pourquoi Stackebrandt et Eders établissent un seuil d'identité de séquences du gène ARNr 16S supérieure à 98,7-99% pour définir une espèce bactérienne, soit entre 15 et 20 nucléotides de différence (Stackebrandt and Ebers, 2006). Cependant tous ces critères sont empiriques et peuvent entrainer des ambiguïtés car l'appartenance à une même espèce est généralement un facteur prédictif de l'ascendance commune, mais pas du degré de similitude entre les organismes (Marakeby et al., 2014)

En raison de l'utilisation fréquente du gène de l'ARNr 16S dans les systèmes de classification, la communauté scientifique a exprimé la nécessité de créer des bases de données regroupant toutes les séquences afin d'avoir un aperçu de la diversité microbienne. Walter Goad fonde une banque de données nommée GenBank, qui devient publique et ouverte à tous en 1982 (Burks et al., 1985), recensant en 2022 plus de 239 millions de séquences déposées et constitue la principale banque nucléique. Par la suite, de nombreuses bases de données publiques et privées ont émergé. De nos jours, la grande partie des séquences dépendent d'un groupe tel que l'*International Nucleotide Sequence Database* (INSDC) travaillant en collaboration avec plusieurs instituts internationaux, tels que *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilisant GenBank, le *European Bioinformatics Institute* (EBI) utilisant EMBL et le *National Institute of Genetics* (NIG) travaillant avec DDBJ. L'ensemble de ces séquences déposées sont toutes assignées à une taxonomie qui suit les règles de (i) *Bergey's Manual Trust* (Garrity et al., 2005; Holt, 1994; Sneath et al., 1986; Vos et al., 2011) et (ii) *The List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (**LPSN**) (Parte, 2014).

Ainsi, la classification des organismes utilisant l'ADN, l'ARN ou certains gènes de ménage a longtemps été très utilisée et favorisée par rapport à celle basée sur l'utilisation de génomes, de par sa rapidité et son faible coût. Néanmoins, les progrès technologiques récents permettent de séquencer des génomes rapidement et à faible coût. Cette possibilité d'obtenir des génomes plus rapidement a évolué vers une utilisation de la phylogénie génomique pour la classification des procaryotes. Cette tendance peut aussi être expliquée par les limites de l'utilisation du gène codant pour l'ARNr 16S dans la systématique bactérienne ; malgré sa prévalence et son excellente conservation dans toutes les bactéries, ce biomarqueur présente plusieurs limites : (i) existence de plusieurs copies au sein d'un génome, (ii) présence d'hétérogénéité génétique entrainant un résolution taxonomique moins qualitative, (iii) biais d'interprétation de la diversité microbienne (Pan et al., 2023). A ce jour, les techniques de classification basées sur le séquençage génomique sont à l'origine de découvertes et de reclassifications taxonomiques (Prinzi and Moore, 2023). Marakeby *et al.* proposent un système de classification qui est exclusivement basé sur la similarité des génomes, sans nécessiter d'analyse phénotypique ou phylogénétique (Marakeby et al., 2014). Leur concept vise à attribuer des codes à chaque organisme dont le génome est séquencé. L'attribution des codes est basée sur la similarité mesurée entre le génome d'un organisme et le génome de l'organisme le plus similaire (ayant déjà un code attribué). Aujourd'hui, Parks *et al.* proposent l'utilisation des génomes et la phylogénie moléculaire pour classifier le vivant et établir des homologies entre eux, donnant naissance à la base de données *Genome Taxonomy Database* (**GTDB**)(Parks et al., 2018). Cette classification est actuellement considérée comme la plus fiable car elle tient compte des relations de parentés entre organismes, même si la fiabilité de ces relations peut être questionnable à certaines échelles de temps. Bien qu'elle ait entrainé beaucoup de modifications des noms des taxons de haut rang et de modifications d'organisation des taxons (e.g. le phylum des *Proteobacteria* a été divisé en plusieurs phylums dont celui des *Pseudomonadota* qui contient les *Alphaproteobacteria* et les *Gammaproteobacteria*) cette classification et sa taxonomie sont à présent la plus utilisée. Au cours de ma thèse, la classification GTDB a été utilisée.

4.1.3. Choix méthodologique et description de la diversité

L'analyse de la diversité peut être abordée par différentes approches indépendantes de la culture. La richesse taxonomique d'un environnement et la structure des communautés microbiennes peuvent être analysées par (i) métabarcoding en utilisant le gène codant pour l'ARNr 16S ou (ii) par métagénomique. Toutefois ces approches sont adaptées pour la caractérisation d'une diversité globale d'un environnement. Dans le cadre de mon projet, l'objectif est de caractériser la diversité taxonomique et fonctionnelle d'un seul type de population ($_{iACC}$MTB), représentée seulement par quelques cellules dans un environnement microbien très diversifié et de corréler ultrastructure et génome. C'est

pourquoi nous devons procéder par des approches différentes, tel que le tri cellulaire grâce à la micromanipulation de cellules uniques.

Une cellule possédant des caractéristiques phénotypiques et génotypiques communes sera assignée à un groupe de cellules partageant ces mêmes caractéristiques. Ce groupe de cellules a été nommé « morphotype ». Nous avons ainsi utilisé l'approche *single-cell* tout au long de cette étude pour caractériser cette diversité afin de corréler le plus précisément possible un morphotype bactérien avec un ARNr 16S voire un génome.

Une fois les différents morphotypes définis, la micromanipulation d'une *single-cell* aux traits morphologiques (spécifiques à chacun des morphotypes) et l'amplification de son ADN génomique (ADNg) a permis l'obtention de séquences ARNr 16S propre à chaque morphotype et le regroupement en OTUs. Par la suite, nous avons choisi d'analyser la diversité de ces populations par le séquençage de leur génome de manière à obtenir des génomes uniques amplifiés (SAG) pour chaque cellule micromanipulée. Des reconstructions phylogénétiques ont été réalisées à la fois en utilisant les séquences ARNr 16S et les génomes afin d'analyser l'affiliation taxonomique des différents morphotypes et leurs plus proches parents. Enfin, la physiologique a été analysée selon les caractères métaboliques de chaque morphotype.

4.2. Analyse de la diversité spécifique des $_{iACC}$MTB par des outils moléculaires

Nous avons réalisé un typage moléculaire des cellules uniques triées au micromanipulateur en séquençant le gène de l'ARNr 16S après avoir amplifié leur génome. Afin de s'assurer que l'identité de la cellule micromanipulée corresponde avec sa séquence ARNr 16S une technique d'hybridation de l'ADN avec des sondes fluorescentes spécifiques (FISH) a été réalisé. Le séquençage de leur génome entier a ensuite été réalisé pour les analyses de phylogénie moléculaire et l'analyse des voies métaboliques putatives.

4.2.1. Amplification du génome entier (WGA)

Afin d'obtenir suffisamment d'ADN génomique pour le séquençage du gène de l'ARNr 16S et le séquençage du génome, l'amplification du génome entier (WGA) a été réalisé sur des cellules uniques micromanipulées (cf. section 3.1). Cette amplification a été réalisée avec le kit REPLI-g Single-Cell (QIAGEN) en suivant les instructions du fabricant, basé sur la technique d'amplification par déplacement multiple (MDA). La concentration d'ADNg double brin a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre QuBit™ 4 (ThermoFisher Scientific) avant d'être utilisé pour le séquençage complet du génome. Au moins trois cellules de chaque morphotype ont été micromanipulées et leur génome amplifié de manière indépendante.

4.2.2. Séquençage de l'ARNr 16S

Il existe plusieurs méthodes de typage moléculaire pour identifier l'appartenance des bactéries à un groupe génétique donné. Le typage moléculaire par séquençage du gène de l'ARNr 16S a longtemps été utilisé, et l'est encore. En épidémiologie des maladies, ce typage basé sur ce seul gène était souvent insuffisant pour discriminer des souches virulentes entre elles. Lorsque le séquençage de gènes s'est démocratisé, et son coût baissé, d'autres typages basés sur des gènes ménages comme MLSA (MultiLocus Sequencing Analysis) ont émergés (Maiden et al., 1998). Aujourd'hui, ces approches n'ont plus vraiment de sens étant donné le développement des méthodes de séquençage du génome, mais elles peuvent être utilisées pour faire un premier tri. Dans notre cas, nous nous supposons que les cellules micromanipulées sont très diverses et sont affiliées à des familles, voire des classes différentes. Nous avons donc choisi de cibler un gène commun à toutes les bactéries, le gène ARNr 16S. Ce gène reste encore important aujourd'hui car il n'est souvent pas assemblé dans les génomes assemblés de metagénomes.

Le gène de l'ARNr 16S de tous les échantillons d'ADNg obtenus par WGA a été amplifié à l'aide de l'enzyme polymérase Flex Hot Start Phusion® (New England Biolabs) en suivant les recommandations du fabricant, à partir d'une concentration d'ADNg de 50-70 ng/µL et des amorces universelles 27F 5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′ et 1492R 5′-TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3′ (Lane, 1991). Les fragments à extrémités franches (i.e. extrémités de fragments d'acides nucléiques en double brin ne portant pas de prolongements simple brin) des séquences du gène de l'ARNr 16S ont été clonées à l'aide du kit de clonage PCR TOPO® Zero Blunt®. La première étape consiste à liguer le fragment dans un vecteur d'insertion, utilisé pour transformer chimiquement des cellules *Escherichia coli* compétentes One Shot® TOP10. La transformation est réalisée en incubant le mélange cellules / vecteur pendant 10 minutes dans la glace et en réalisant un choc thermique 30 secondes à 42°C au bain-marie puis dans la glace. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 1h sous agitation dans 250µL de milieu nutritif S.O.C (*Super Optimal broth with Catabolite repression*). Les colonies sont ensuite sélectionnées à partir de boite de Pétri contenant du milieu solide LB (*Lysogeny Broth*) contenant de la Kanamycine (50µg/mL). Chaque colonie représente une bactérie contenant un plasmide avec une séquence d'ADNr 16S. Les plasmides d'au moins 5 colonies sont extraits avec le kit Wizard® Plus SV Minipreps Start-Up Kit à partir de cultures de LB liquide.

Les inserts ont été extraits des plasmides par une digestion avec l'enzyme de restriction EcoRI afin de réaliser du RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction). La digestion enzymatique a été réalisée à l'aide d'EcoRI, du Buffer CutSmart® et du plasmide purifié. Après incubation à 37°C pendant 30 minutes, une étape d'électrophorèse sur gel d'agarose a été réalisée afin observer la migration des fragments d'ADN. Cette approche est réalisée afin i) de vérifier que l'insert est bien présent dans le plasmide des différents clones, ii) de vérifier que les profils d'électrophorèse des 5 clones

d'un même *single-cell* sont les mêmes et iii) d'identifier les profils d'électrophorèse différents entre les différents *single-cell*.

Les plasmides contenant les inserts sont alors envoyés à la compagnie Eurofins pour effectuer un séquençage avec la méthode de Sanger en 5' et 3'. Une fois obtenues, la qualité des séquences est vérifiée (e.g. 900 - 1000 pb doivent avoir été séquencés a minima) Les séquences sont ensuite nettoyées en supprimant les séquences d'amorces PCR et assemblées avec le logiciel d'analyse de séquences BioEdit (Hall, 1999). Les séquences ont été comparées avec l'outil d'alignement BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Toutes les séquences ARNr 16S ayant un seuil d'identité strictement supérieure à 97% ont été regroupées dans une OTU. Les séquences des OTUs ont été comparées à celles de la base de données publique NCBI « *Nucleotide Collection (Nr/Nt)* » en sélectionnant d'abord uniquement les séquences de souches type uniquement, et une seconde fois en incluant celles de toutes les séquences environnementales et/ou uncultivées. Cette comparaison a été effectuée avec l'outil BLASTN et les paramètres par défaut qui permettent d'aligner des séquences deux à deux pour en trouver les régions similaires et identiques. NCBI permet d'obtenir les séquences de la base données pour lesquelles la valeur de l'espérance mathématique calculée (*E-value*) est inférieure à 10^{-10} et liste les séquences par ordre décroissant de score d'alignements, et en général par ordre décroissant de pourcentage d'identité.

4.2.3. Authentification de l'ARNr 16S par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

La taille microscopique des bactéries n'exclut pas la possibilité de micromanipuler une autre cellule à proximité qui aurait pour conséquence une mauvaise assignation taxonomique. D'autre part, il est très facile d'amplifier de l'ADN contaminant. Des étapes de vérification sont donc nécessaires pour attribuer une séquence du gène de l'ARNr 16S à chaque cellule/morphotype micromanipulée. Nous avons validé l'affiliation d'une séquence d'ADNr 16S à une cellule de morphotype donné par une technique de cytogénétique : l'Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et la microscopie à fluorescence et confocale. Cette technique lie des sondes oligonucléotidiques spécifiques couplées à un fluorochrome à des régions chromosomiques pour révéler un fort degré de complémentarité des séquences.

Le protocole de FISH utilisé est similaire à celui décrit par Pernthaler *et al*., (2001). Tout d'abord, des sondes spécifiques ont été fabriquées à partir des séquences du gène d'ARNr 16S les plus représentatives de chaque morphotype. L'absence d'identité avec d'autres espèces a été vérifiée à partir de l'alignement avec des séquences de gènes d'ARNr 16S les plus similaires trouvées dans la base de données GenBank en décembre 2021. La spécificité de la sonde est évaluée en utilisant le programme PROBE_MATCH dans le RDP-II (Cole et al., 2003). Les résultats non ciblés les plus proches contiennent au moins une non-concordance avec la sonde spécifique. Le fluorochrome ATTO488 a été

greffé en 5' de ces séquences nucléotidiques d'une vingtaine de bases. Les sondes oligonucléotidiques utilisées dans cette étude ont été commandées chez Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne).

Des préparations ont été réalisées avec des $_{iACC}$MTB et d'autres MTB, et plusieurs marquages ont été réalisés pour vérifier la spécificité des sondes construites. Une coloration au fluorochrome DAPI est utilisée pour marquer l'ADN double brin de manière aspécifique. La sonde EUB388 est également utilisée pour marquer spécifiquement la présence d'ADN bactérien. Cette dernière est marquée avec un autre fluorochrome ATTO633 et se lie de manière spécifique à l'ARNr 16S de toutes les bactéries (Amann et al., 1990). Les sondes ont été utilisées toutes ensembles sur une même préparation. La sonde et donc la séquence d'ADNr 16S, est validée uniquement lorsque (i) les cellules du morphotype analysé fluorescent aux longueurs d'onde du fluorochrome ATTO488 et (ii) quand les autres cellules fluorescent uniquement aux longueurs d'onde des fluorochromes DAPI et ATTO633. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission pour chaque fluorochrome ont été paramétrées : ATTO633 (630-651 nm), ATTO488 (500-520 nm) et le DAPI (350-470 nm).

La préparation des lames pour les observations en microscopie confocale a consisté à déposer une goutte propre de 10 µL d'échantillon filtré du lac Pavin (0,2 µm) et une goutte de 20 µL de cellules concentrées magnétiquement sur une lame adhésive Superfrost Plus Gold (Thermo Scientific Menzel) avec le pôle sud d'un aimant positionné d'un côté de la lame. De cette manière les cellules magnétotactiques sont transférées vers l'eau filtrée propre. Après 10 min de migration, la goutte de 20 µL contenant des particules de sédiments, est retirée de manière à laisser uniquement la goutte propre avec les cellules d'intérêt sur la lame. Les cellules adsorbées sur la lame ont été fixées pendant la nuit avec 20 µL d'une solution de paraformaldéhyde à 4 %. Les cellules fixées ont ensuite été déshydratées par des incubations en série dans de l'éthanol à 50%, 80% et 100% pendant 5 min chacune. La solution d'hybridation contenait 10 ng/mL de la sonde, 0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM Na_2EDTA, et 0,01% de dodécylsulfate de sodium (SDS), en utilisant les stringences d'hybridation et de lavage recommandées pour chaque sonde (35% pour les sondes spécifiques). L'hybridation est réalisée à 46°C pendant 2 h. Le montage des lames a été réalisé à l'aide de 5 µL de solution de ProLong avec ou sans DAPI (4,6-diamidino-2-phényl- indole) à 1 µg/mL en fonction du puit (e.g. témoin négatif, témoin positif). Les lames sont incubées pendant 10 min à 4 °C et rincées à l'eau, puis conservées à 4 °C dans une chambre humide avant leur observation. Les lames ont été observées à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence Zeiss LSM780 disponible sur la plateforme ZooM du BIAM. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission pour chaque fluorochrome sont paramétrées : ATTO633 (630-651 nm), ATTO488 (500-520 nm) et le DAPI (350-470 nm). Les images ont été collectées avec le logiciel ZEN.

5. Caractérisation de l'ultrastructure des bactéries et des structures internes

Afin de caractériser l'ultrastructure des bactéries, différentes techniques de microscopie électronique ont été utilisées. Avec un faisceau d'électrons qui traverse l'ensemble de l'échantillon, le microscope électronique en transmission (MET) permet d'observer les organites intracellulaires avec une haute résolution des cellules entières ou en coupe. *A contrario*, le microscope électronique à balayage (MEB) fait intervenir un faisceau d'électrons qui au lieu de traverser l'échantillon, balaye toute sa surface, ce qui permet de visualiser la surface d'une bactérie.

5.1. Microscopie électronique en transmission (MET)

L'ultrastructure des iACCMTB pour chaque morphotype (e.g. morphologie, taille des inclusions et disposition) et celle de leurs magnétosomes (e.g. morphologie, taille et disposition) ont été observées après fixation des cellules sur une grille en cuivre recouverte d'un film de carbone. Une goutte de poly-L-lysine a de plus été déposée sur les grilles de MET (côté carbone) afin d'améliorer l'adsorption des cellules sur la grille. La préparation des grilles MET pour l'observation des MTB consiste à déposer une goutte de 2 µL de MTB concentrée magnétiquement et à les attirer sur le bord de la goutte en utilisant leur magnétotactisme avec un aimant positionné à côté de la grille (**Figure 64**). Cette technique permet leur agrégation sur un côté au bord de la goutte sur la grille (i.e. côté *north seeking* grâce à l'aimant positionné direction sud en direction de la goutte). La concentration des cellules sur le bord de la goutte se fait pendant 15 minutes pour laisser le temps aux MTB de nager vers le bord de la goutte, de s'y concentrer, de s'agréger au bord de la goutte et de s'adsorber à la poly-L-lysine. La grille est ensuite lavée avec de l'eau milliQ filtrée. Les analyses de microscopie électronique ont été réalisées avec le microscope Tecnai G2 BioTWIN équipé d'une caméra CCD (Megaview III) en utilisant une tension d'accélération de 100 kV. Le microscope utilisé se trouve à l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) sur le site de Cadarache.

L'ensemble des données acquises sur les différents morphotypes a été extrait à partir d'images de microscopie optique, de MET et MEB pour identifier et comparer des caractéristiques ultrastructurales au sein des morphotypes principaux de iACCMTB. La taille des cellules et des magnétosomes (longueur/largeur) ainsi que celle des iACC (diamètre) a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (v 1.53). Le nombre d'inclusions (iACC et magnétosomes) par cellule a été compté. Pour chaque nous avons calculé une moyenne et un écart-type.

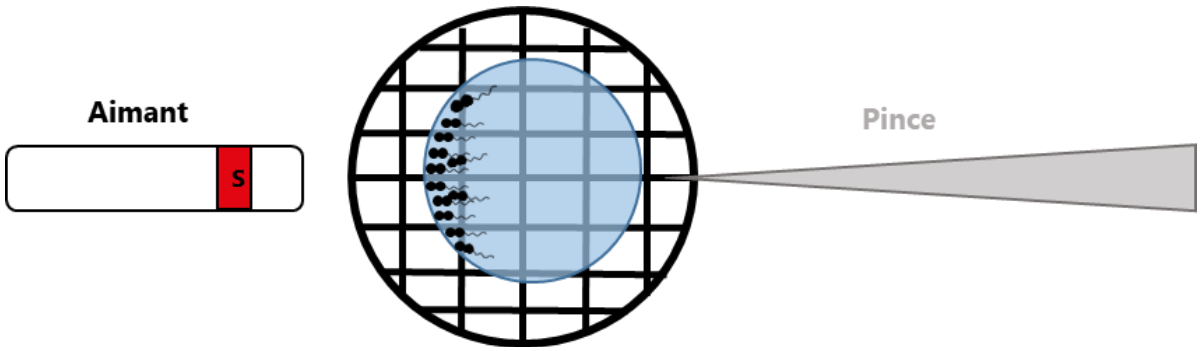


Figure 64 : Représentation schématique illustrant la stratégie de préparation de grilles de microscopie électronique en transmission (MET). Cette méthode permet d'agréger les MTB au bord de la goutte (coloré en bleu) augmentant ainsi le nombre de cellules adsorbées sur la grille et rendant les observations au microscope plus rapide.

5.2. Coupes ultra-fines par ultramicrotomie

Afin de visualiser les structures intracellulaires faiblement contrastées et les microcompartiments présents dans les cellules, nous avons inclue les MTB du lac Pavin dans de la résine pour réaliser des coupes ultra-fines à l'ultramicrotome (**Figure 65**).

Les MTB ont été prélevées et récoltées des microcosmes suivant les méthodes décrites précédemment. Après avoir prélevé plusieurs culots de cellules concentrées magnétiquement, les cellules ont été fixées dans une solution de Glutaraldéhyde 2,5 % et cacodylate 0,1 M à pH 7 préparée dans de l'eau du lac Pavin filtrée, puis conservés à 4°C. Du tétroxyde d'osmium 1 % (pas moins de 0,5 % et pas plus de 2 %) a permis de contraster les échantillons en vue des observations au microscope électronique. Après l'incubation 1 h à 4°C, les échantillons ont été lavés, mélangés avec de l'agarose "low melting" (Sigma-Aldrich) à 2 %, puis coupés en petit blocs d'environ 1 mm^3. Ces morceaux ont été placés dans des tubes avec de l'eau milliQ et de l'acétate d'uranyle less 2% (UranylLess), puis conservés à 4°C. Les échantillons ont été déshydratés progressivement dans des bains d'alcool à différentes concentrations (30, 50, 70, 90 % CH_3CH_2OH). Ensuite, ils ont été inclus progressivement dans une résine spécifique composée d'Embed 812, de Dodecenyl Succinic Anhydride (DDSA), N-Methylaniline (NMA) et de Benzyl Dimethyl Amine (BDMA). Les inclusions ont été transférées dans des moules puis incubées à 60°C pendant 48 heures pour permettre la solidification de la résine. Les blocs de résine ont été taillés en plusieurs étapes pour obtenir des coupes fines de 100 nm d'épaisseur (**Figure 65**). Les coupes sont réalisées à l'aide de couteaux en diamant sur l'Ultramicrotome Leica EM UC7. Les coupes fines sont placées sur des grilles de microscopie électronique, puis colorées avec de l'uranyle less et du citrate de plomb 3% (Reynolds Lead Citrate, UranyLess). Les grilles sont observées au MET.



Figure 65 : Photos représentant les différentes étapes de la taille des inclusions de résine pour la réalisation des coupes ultra-fines à l'ultramicrotome à l'aide d'un couteau en diamant en utilisant l'Ultramicrotome Leica EM UC7.

5.3. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les culots de MTB contenant les iACCMTB ont été concentrés puis transférés sur un filtre en carbone avec une porosité de 0,2 µm dans un système de support Swinnex. Les particules de plus de 0,2 µm, dont les iACCMTB sont ainsi retenues sur le filtre. Ce filtre est ensuite rincé avec de l'eau milliQ, séché puis collé sur un plot MEB en aluminium à l'aide d'un scotch en carbone double face. Suite à cette étape, les échantillons ont été métallisés avec une fine couche de carbone de manière à ce que toute la surface soit conductrice pour permettre l'écoulement des électrons en excès. Enfin les analyses ont été réalisées à l'aide d'un MEB Zeiss Ultra55. Afin d'observer les carbonates intracellulaires et de les analyser par spectrométrie des rayons X, la puissance de la tension d'accélération utilisée était entre 10 et 15 eV et une distance de travail de 7,3-7,6 mm pour chacun des morphotypes. Ces expériences ont été réalisées à l'IMPMC sur le campus de Sorbonne Université avec Karim Benzerara et Romain Bolzoni.

6. Méthodes de caractérisation des biominéraux

A ce jour, différentes techniques sont utilisées pour la caractérisation des biominéraux. Toutefois certaines méthodes sont plus appropriées que d'autres selon le type de minéral et la réalisation de préparation d'échantillon. Pour la caractérisation des iACC et des magnétosomes, différentes approches de microscopie électronique, de spectrométrie des rayons X et de synchrotron ont été utilisées.

6.1. Présentation générale des techniques utilisées pour la caractérisation de biominéraux

De nombreuses techniques ont été développées ces dernières décennies pour distinguer un minéral d'un corps organique et entreprendre la caractérisation de biominéraux. Le

MET est l'appareil le plus couramment utilisé pour la caractérisation des minéraux. A elle seule, cette méthode n'est pas suffisante pour la détection d'éléments chimiques. Il faut au minimum que le MET ou STEM soit couplé à un spectroscope de rayons X à dispersion d'énergie (XEDS) ou à un spectroscope de perte d'énergie des électrons (EELS) pour détecter, quantifier les éléments chimiques au sein du minéral.

Les avancées technologiques couplant la microscopie et la spectroscopie (e.g. STXM, STEM-XEDS, STEM-EELS) ont permis la détection de spectres d'énergie atomique pour la zone étudiée d'intérêt (e.g. la cellule ou le minéral). Par exemple, il est possible de délimiter manuellement une aire de mesure et d'obtenir les spectres d'énergie pour chaque atome détecté sur cette aire paramétrée. De la sorte, grâce à des spectres de référence, il est possible d'émettre des hypothèses quant à la nature du composé organique (ADN, protéine, polysaccharide) ou minéral (e.g. carbonates, phosphates, oxydes). Par exemple, des auteurs ont étudié spécifiquement la biominéralisation de cellules de *Caulobacter crescentus* dans différentes conditions de culture. Dans un milieu spécifique, ils ont détecté et associé des signaux très intenses de carbonate, de phosphore et de calcium qui semblent être co-localisés et provenir des cellules (Benzerara et al., 2004).

Les approches synchrotron telles que la microscopie à rayons X en transmission et à balayage (STXM) couplée à la spectroscopie de structure près du front d'absorption de rayons X (XANES) s'avèrent utiles pour l'étude des processus de carbonatogenèse par les microorganismes (Benzerara et al., 2004). En effet, cette technique permet d'obtenir des spectres d'énergie très résolutifs à des échelles nanoscopiques permettant d'obtenir des informations précises de composition et de nature des biominéraux. Toutefois, les analyses STXM-XANES nécessitent un certain temps de préparation d'échantillons. De plus, l'extraction des données brutes ainsi que le traitement des résultats nécessitent l'acquisition de logiciels spécifiques et peut prendre beaucoup de temps. La nature carbonatée des inclusions riches en calcium dans les MTB du lac Pavin a également été mise en évidence par STXM-XANES décrit dans Monteil et al., (2021).

La microscopie Raman peut être utilisée pour la détection de carbonates intracellulaires amorphes (Benzerara et al., 2021; Wang et al., 2012) et pour la détection de carbonates de manière plus générale (Urashima et al., 2022).

Nous avons choisi la méthode de STEM-XEDS pour connaitre la composition chimique des inclusions. Cette technique a été choisi pour : (i) la rapidité de préparation des échantillons (grille de microscopie électronique), (ii) la précision des analyses grâce à la délimitation manuelle d'une aire de mesure pour obtenir des spectres d'énergie pour chaque atome détecté sur cette aire paramétrée, (iii) la présence d'un détecteur dédié à l'imagerie en mode balayage et permettant la réalisation d'images avec un contraste optimal en champ noir annulaire à grand angle (STEM-HAADF) et en champ clair (STEM-BF) pour l'observation et la distinction des différentes inclusions, et (iv) son importante résolution spectrale et spatiale.

6.2. Identification de la composition chimique des carbonates amorphes par des analyses chimiques couplées au TEM/STEM

Les grilles de microscopie électronique contenant des cellules entières ont été généralement observées au MET du CEA de Cadarache pour faire un repérage des cellules d'intérêt puis amenées à l'IMPMC pour réaliser des analyses de composition et de structure des biominéraux présents dans les bactéries. Un microscope électronique en transmission à haute résolution (HRTEM), l'imagerie à contraste z en mode champ noir annulaire à grand angle (STEM-HAADF), et la cartographie élémentaire par XEDS ont été réalisées à l'aide d'un microscope JEOL 2100 F (**Figure 66**). Cette machine, fonctionnant à 200 kV, est équipée d'un canon à émission Schottky, pièce polaire à ultra haute résolution, et d'un détecteur JEOL XEDS une fenêtre ultrafine.

La spectroscopie EELS est une technique d'analyse dans laquelle le matériau à analyser est exposé à un faisceau d'électrons dont l'énergie cinétique est située dans une plage relativement étroite. Les spectres de pertes d'énergie des électrons ont été enregistrés sur le microscope JEOL 2100F de l'IMPMC. Ce microscope est équipé d'un canon à émission Schottky lui conférant une résolution spectrale de l'ordre de 1 eV (largeur à mi-hauteur du pic de perte nulle). Les spectres ont été obtenus en mode diffraction avec un semi-angle de collection estimé à 30 mrad et une dispersion égale à 0.1 eV par canal dans la gamme 270 – 340 eV pour le seuil K du carbone. Pour les spectres représentés ci-après, le fond continu a été soustrait en utilisant un modèle en loi de puissance. L'intensité et la taille du faisceau utilisé en mode STEM-XEDS ont été optimisées pour conserver une bonne résolution spatiale et préserver l'intégrité des inclusions (sensibles au faisceau d'électrons). Il en a été de même pour le dwell-time (temps de comptage pour chaque pixel). Le détecteur XEDS est un détecteur Si(Li) de marque JEOL. Ces analyses ont été réalisées avec Nicolas Menguy partenaire du projet ANR CarboMagnet.

6.3. Identification de la structure minéralogique des magnétosomes par des analyses de diffraction au HRTEM

La microscopie électronique en transmission haute résolution (HRTEM pour *high resolution transmission electron microcopy*) permet d'utiliser des grossissements suffisamment élevés pour visualiser l'espacement des motifs atomiques au sein du minéral. Les analyses HRTEM ont été réalisées à l'aide d'un microscope JEOL 2100 F, à l'IMPMC (**Figure 66**). Cette machine, fonctionnant à 200 kV, était d'émission Schottky, d'une pièce polaire à ultra-haute résolution et d'un détecteur JEOL XEDS à fenêtre ultrafine. Les images HRTEM ont été obtenues avec une caméra Gatan US4000 à dispositif à couplage de charge (CCD).

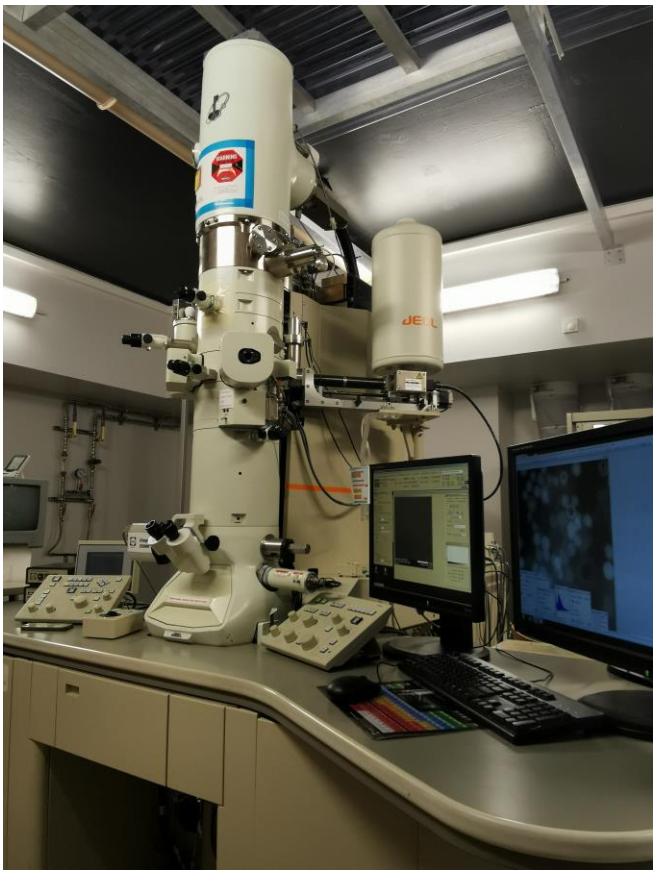


Figure 66 : Photographie du microscope électronique en transmission (MET) JEOL 2100 F à l'Institut IMPMC, Paris.

6.4. Spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS)

Les MTB concentrées magnétiquement d'échantillons environnementaux ont été déposées sur des grilles MET pour être analysées à la ligne de faisceau de la nanosonde à rayons X durs (I-14) au synchrotron Diamond (Didcot, UK) (https://www.diamond.ac.uk/Instruments/Imaging-and-Microscopy/I14.html).

Des mesures de microscopie à fluorescence X à balayage (SXFM) ont été effectuées dans des conditions ambiantes en utilisant une énergie photonique incidente de 11,5 keV

avec 4 détecteurs Si-drift dans la direction de rétrodiffusion de l'échantillon pour collecter des spectres de fluorescence X (XRF) à chaque pixel cartographié. La dimension du faisceau de rayons X focalisé a été mesurée à ~ 70-80 nm (FWHM). Un pas de balayage de 50 nm a été utilisé avec un temps d'arrêt de 15 ms pour collecter des cartes XRF à haute résolution. Les spectres XRF ont été calibrés, soustraits du bruit de fond et ajustés avec les lignes d'émission Kα et Lα des éléments suspectés dans l'échantillon (par exemple, Cl, P, S, Ca, Fe, Ba). Outre Ba Lα, Fe Kα, Ca-Kα et Cl-Kα, tous les autres pics XRF détectés étaient nettement moins intenses. Des cartes spécifiques aux éléments ont été générées en traçant le changement d'intensité XRF de chaque ligne d'émission Kα ajustée sur la région cartographiée.

Des matériaux de référence ont été préparés sous forme de pastilles et utilisés pour la comparaison qualitative et l'analyse quantitative des données XAS ($BaCO_3$, BaO et $Ba_3PO_4)_2$). Les matériaux de référence ont été combinés et mélangés avec de la cellulose (à l'aide d'un pilon et d'un mortier) pour obtenir une longueur d'absorption des rayons X au seuil d'absorption Ba-L3. Les mesures XAS du seuil d'absorption Ba-L3 des références ont été collectées en mode transmission à l'aide d'un détecteur à photodiode. En raison des hétérogénéités des pastilles de référence, seules les données XAS de la référence $BaCO_3$ ont été considérées comme adéquates en termes de qualité des données. En utilisant cette référence et une référence $BaCO_3$ mesurée par Finch *et al*. (Finch et al., 2010), l'ensemble des données a été étalonné énergétiquement par rapport à l'ensemble des données recueillies à l'I-14 et a ensuite été utilisé pour (i) comparer les données XAS des carbonates de baryum et pour (ii) effectuer un ajustement par combinaison linéaire. Pour collecter les données XAS de raie d'émission Ba-L3 de l'échantillon, une cartographie nano-XANES a été réalisée en collectant une série de cartes XRF au seuil Ba-L3. Pour corriger la dérive pendant la mesure et pour aligner les cartes par la suite, le signal XRF Ca Kα a été utilisé comme caractéristique de suivi et de post-alignement. Des régions de granules intracellulaires de grande taille ont été sélectionnées pour extraire le spectre XAS afin de le comparer à divers matériaux de référence Ba.

La technique utilisée pour cartographier l'échantillon est appelée nano-XRF (fluorescence X), bien qu'elle porte également d'autres noms (comme SXFM, voir ci-dessus). Les faisceaux de synchrotron qui utilisent cette technique sont appelés nanosondes à rayons X. Un faisceau de rayons X intense généré par le synchrotron est utilisé. Celui-ci est de taille nanométrique (~70-80 nm) et à haute énergie (~11,5 keV) pour cartographier la région d'intérêt de l'échantillon. Cela permet l'excitation par rayons X de nombreux éléments et métaux, avec la possibilité de cartographier les détails au niveau d'une cellule unique à haute résolution. De nombreuses données sont collectées. En effet, chaque pixel (qui correspond à la taille des moteurs, par exemple un pixel de 50 nm) contient un spectre XRF. Les éléments et les métaux d'intérêt (par exemple Fe, Cl, Ca, Ba, etc.) ont été ajustés dans les données XRF et leurs intensités sont reportées sur la région cartographiée pour donner les différentes cartes XRF des métaux. Pour recueillir

les données XAS du seuil L3 du Ba, l'énergie est réduite à ~5 keV, puis les cartes sont prises à une énergie croissante jusqu'à ce que l'absorption de Ba soit dépassée. L'intensité XRF du Ba est ensuite tracée en fonction de l'énergie, ce qui permet d'obtenir les données XAS. La région contenant les plus grosses particules a été sélectionnée afin de produire le spectre XAS de la meilleure qualité possible pour la comparaison avec les matériaux de référence du Ba.

Les analyses au synchrotron ont été entièrement réalisées par Daniel Chevrier, chercheur CNRS au BIAM.

7. Génomique et phylogénie moléculaire

7.1. Séquençage du génome entier à partir d'une seule cellule

Lorsque l'on souhaite étudier la diversité de populations bactériennes par des approches indépendantes de la culture, l'obtention du génome est de nos jours un outil indispensable et précieux. Ainsi, une caractérisation génomique sans culture de $_{iACC}$MTB pourrait nous permettre de mieux comprendre leur biologie, leur évolution, la base fonctionnelle de la formation des iACC, et *in fine* le rôle de ces populations dans les cycles biogéochimiques du lac Pavin. L'ADNg amplifié précédemment par WGA d'une vingtaine de *single-cell* dont les séquençages ARNr 16S n'ont pas montré la présence d'un ADN contaminant a été envoyé à séquencer au Genoscope, un de nos partenaires dans le projet ANR CarboMagnet (2021-2024).

L'ADNg des $_{iACC}$MTB a été séquencé en utilisant une combinaison des technologies Illumina et Oxford Nanopore. Tout d'abord, 3 µg d'ADN amplifié ont été traités avec l'endonucléase I T7 (New England Biolabs) pour résoudre les ramifications dues au mécanisme de déplacement multiple.

Pour le séquençage Illumina, 250 ng d'ADN ont été soniqués pour obtenir une gamme de taille de 100 à 1 000 pb à l'aide de l'instrument Covaris E220 (Covaris, Inc.). Les fragments ont été réparés et 3′ adénylés, et les codes-barres NEXTflex HT ont été ajoutés (BioScientific Inc.). Le produit a été amplifié en utilisant 12 cycles PCR avec le kit Hifi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems) et purifié avec le réactif AMPure XP 0,8x. Après analyse du profil de la librairie à l'aide du bioanalyseur Agilent 2100 et de la PCR quantitative (qPCR) (MxPro ; Agilent Technologies), la librairie a été séquencée à l'aide d'un instrument Illumina NovaSeq 6000. Au total, nous avons obtenu ~10^7 lectures pairées pour chaque SAG. Les lectures Illumina ont été trimmées en supprimant les nucléotides de faible qualité (Q < 20), les adaptateurs de séquençage et les séquences de <30 nucléotides (nt), à l'aide de l'ensemble FastX-Toolkit.

Pour le séquençage Nanopore, 1 µg d'ADN a été utilisé pour la préparation de la bibliothèque en suivant le protocole 1D Native barcoding genomic DNA avec le kit de ligature EXP-NBD104 et SQK-LSK109 (Oxford Nanopore). Les bibliothèques ont été

séquencées à l'aide d'une cellule de flux Nanopore R9.4.1 revD et du dispositif PromethION avec les logiciels MinKNOW v.4.5.4 et Guppy v.5.1.13 + b292f4d13. Un assemblage hybride a été lancé pour chaque SAG en utilisant SPAdes v.3.13.0 avec l'option sc (Antipov et al., 2016). La complétude, la contamination et la redondance de l'assemblage des différents SAG ont été estimées à l'aide de checkM v.1.0.11 (Parks et al., 2015) avec un ensemble de marqueurs spécifiques aux rangs taxonomiques de chacun des SAGs.

Le metagénome de la colonne d'eau ayant permis d'assembler le génome de l'*Azospirillacae* sp. CCP5-WCLP8 a été obtenu à partir de l'ADN extrait d'un culot de 10^9 cellules de MTB. Ce culot a été obtenu à partir de la concentration magnétique réalisée à partir de 200L d'eau prélevée au niveau de l'OATZ au pic de MTB en octobre 2021. L'ADN total a été extrait avec une méthode classique au phénol / chloroforme comme dans Benidire et al., (2020) directement des homogénats à l'aide d'un tampon TE additionné de protéinase K (20 mg/mL), de lysozyme (10 mg/mL), de SDS (10 %) et de sarkosyl. Les échantillons ont été traités avec du phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1, pH 8), brièvement mélangés et centrifugés pendant 1 h à 4 °C. Le surnageant a ensuite été transféré dans des tubes stériles remplis de chloroforme/alcool isoamylique (24:1), mélangé et centrifugé pendant 1 minute à 4 °C. La phase aqueuse a ensuite été recueillie. L'ADN a été précipité pendant une heure à l'aide d'isopropanol absolu à température ambiante, culotté par centrifugation (10000 rpm pendant 5 min à 4 °C), lavé dans de l'éthanol à 70 % et élué dans 50 µL de tampon TE.

Une procédure de séquençage et d'assemblage équivalente a été réalisée avec les mêmes technologies et le même assembler que pour les SAGs, mais en générant ~10^8 lectures Illumina pairées et sans l'option –sc de SPAdes. Les contigs de plus de 1000 pb ont été utilisés comme entrée pour le workflow métagénomique Anvi'o (Eren et al., 2021) afin d'effectuer le *binning* manuel. Le *binning* est une étape en métagénomique permettant de trier les contigs sur la base des fréquences tétranucléotidiques, leur couverture, ainsi que l'assignation taxonomique des lectures avec le programme Kaiju (Menzel et al., 2016). Cette approche a permis de créer une douzaine de *bins* de qualité variable, correspondant chacun à un MAG. Leur assignation taxonomique et l'analyse de leur complétude a été également estimée à l'aide de checkM v.1.0.11 (Parks et al., 2015), nous permettant de sélectionner un MAG CCP5-WCLP8 avec une séquence d'ARNr 16S identique avec celles des $_{iACC}$MTB du morphotype 5.

7.1.1. Annotation fonctionnelle des génomes

L'annotation fonctionnelle automatique des différents SAGs et du MAG a été réalisée avec la plateforme MicroScope (Vallenet et al., 2020). Cette plateforme d'annotation et d'analyse génomique microbienne développée par le laboratoire partenaire du Genoscope, le LABGeM, combine de nombreux outils permettant l'annotation

fonctionnelle, des analyses de génomique comparative et la reconstruction de réseaux métaboliques (Vallenet et al., 2006, 2009, 2020). Des annotations expertes peuvent également y être réalisées.

Une première étape est l'**annotation structurale** (ou annotation syntaxique) visant à identifier et localiser les régions codantes d'une séquence (e.g. gènes, séquence régulatrices) pour prédire la position des gènes. L'annotation structurale étudie donc les homologies entre les différents types d'ADN afin d'identifier les séquences conservées et potentiellement fonctionnelles. La seconde étape est l'**annotation fonctionnelle** qui vise à comparer les séquences génomiques obtenues aux banques de données constituées de séquences préalablement annotées, par des méthodes d'alignement de séquence et de recherche de domaines/motifs spécifiques à certaines fonctions biologiques.

En réalisant l'annotation fonctionnelle des génomes, MicroScope relie chaque protéine à une activité enzymatique et un identifiant EC classant les enzymes en fonction des réactions chimiques qu'elles catalysent. Puis les reconstructions de voies métaboliques se font à l'aide du logiciel PathoLogic (Karp et al., 2010) et de la base de données de référence des voies métaboliques MetaCyc (Caspi et al., 2012). Le taux de complétude pour chacune des voies du réseau métabolique est calculé pour chaque génome puis stocké dans une base de données Pathway/Genome Database (PGDB), qui est connectée à l'interface *Magnifying Genome* (MaGe) de la plateforme MicroScope (Vallenet et al., 2013). Un « taux de complétude » d'une voie X est défini comme le ratio du (nombre de réactions pour la voie X détectée dans le génome de l'organisme / le nombre total de réactions dans la même voie X définie dans la base de données MetaCyc. Ces données sont complétées avec celles des fonctions enzymatiques prédites sur les cartes métaboliques provenant de la base de données *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (Kanehisa et al., 2012).

7.1.2. Reconstruction phylogénétique

Nous avons utilisé GTDB-Tk v2.1.1 (Chaumeil et al., 2022) pour assigner chaque SAG / MAG à un groupe taxonomique. Les résultats de l'analyse GTDB-tk nous ont permis de déterminer le rang taxonomique avec lequel travailler pour la construction des arbres phylogénétiques. Deux arbres principaux ont été construits (1) un arbre des *Azospirillaceae* raciné avec une sélection de génomes représentant les *Rhodospirillaceae* (basé sur le papier de Muñoz-Gómez et al., (2019)) et (2), un arbre des *Gammaproteobacteria* raciné avec une sélection de génomes représentant les ordres des *Alphaproteobacteria*. L'arbre des *Gammaproteobacteria* nous a permis d'identifier les ordres/familles et les autres groupes monophylétiques non caractérisés/décrits.

Nous avons utilisé les 120 marqueurs sur lesquels GTDB-tk se base pour construire l'arbre bac120.tree. Par contre, nous avons construit les arbres avec notre propre protocole. Nous avons construit un jeu de génomes pour chaque arbre en sélectionnant les génomes de bonne qualité (i.e. >90% complets avec <5% redondance suivant checkM). Pour les *Azospirillaceae* nous avons pris tous les génomes respectant ce critère sauf pour

le genre *Azospirillum* pour lequel nous avons fait une réduction taxonomique pour ne sélectionner au final uniquement quelques génomes les plus réprésentatifs. Pour les *Gammaproteobacteria*, le nombre de génomes respectant ce critère étant astronomique (>91k), nous avons sélectionné au hasard un génome de bonne qualité représentant chaque ordre de la classification GTDB en privilégiant les *representative genomes* et les génomes de souches types. Pour les ordres potentiellement proches des iACCMTB comme les *Thiohalomonadales*, les *Methylococcales*, les *Nitroscococcales* et les *Chromatiales*, les génomes de deux genres pour chaque famille ont été sélectionnés. Enfin, le jeu de génomes de *Gammaproteobacteria* a été complété avec tous les génomes identifiés comme étant dans le même groupe qu'une ou plusieurs iACCMTB.

Pour chaque jeu de génomes, tous les génomes ont d'abord tous été rapidement réannotés avec PROKKA v 1.14.6 (Seemann, 2014) pour homogénéiser les prédictions des séquences codantes. Les séquences des 120 marqueurs ont ensuite été extraites avec un pipeline développé au laboratoire en utlisant pyhmmer 0.8.0 (Larralde and Zeller, 2023) et les modèles de Markov Cachés (HMMs) de chacun des 120 marqueurs en utilisant le seuil de rassemblement « gathering cutoff » (GA) du *bit score* donné pour chaque profil pour définir un homologue correspondant. Afin de limiter le nombre de données manquantes (gaps) dues à des assemblages incomplets, nous avons sélectionnés uniquement les génomes dans lesquels plus de 90% des marqueurs ont été détectés (à l'exception des génomes de iACCMTB et ceux des MAGs les plus proches), et nous avons éliminé les marqueurs détectés dans moins de 90% des génomes. L'alignement des séquences multiples a ensuite été effectué avec avec MAFFT v7.490 (Katoh and Standley, 2013), trimmé avec BMGE v1.12 (Criscuolo and Gribaldo, 2010) et concaténées en un seul alignement pour chaque marqueur. Des arbres ont été construits avec la méthode du maximum de vraisemblance implémentée dans le logiciel IQTREE v2.2 (Minh et al., 2020; Nguyen et al., 2015) et un modèle de substitution sélectionné sur l'alignement global avec ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) avec l'option -MFP. La robustesse des branches a été estimée par le test du rapport de vraisemblance SH-aLRT (1 000 replicas), et par la méthode de bootstrap non paramétrique (500 ré-échantillonages). Un modèle à partition n'a pas été jugé nécessaire ici suite au bon support des topologies obtenues avec cette approche. Les arbres ont été dessinés et édités avec FigTree v1.4.4 (Rambaut, A., 2010) et le logiciel Inkscape.

Chapitre I : Étude de la diversité des *Pseudomonadota* magnétotactiques formant des carbonates de calcium dans le lac Pavin

Récemment, une alphaprotéobactérie magnétotactique capable de biominéraliser à la fois des iACC et des cristaux de magnétites intracellulaires a été décrite. Ces bactéries ont été retrouvées à la fois dans la colonne d'eau et dans les sédiments au niveau de l'OATZ du lac Pavin. Ce cas de double biominéralisation soulève plusieurs questionnements, notamment leur origine, leur relation et leur évolution. La découverte de ces bactéries de la classe des *Alphaproteobacteria* a permis également d'élargir le processus de carbonatogénèse intracellulaire de deux à trois taxons de bactéries, très éloignés les uns des autres (i.e. *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* et *Cyanobacteria*). Ces cellules de MTB formant des granules de $CaCO_3$ ont permis de décrire le premier morphotype de $_{iACC}$MTB au lac Pavin (Monteil et al., 2021) ; une cellule de 4µm de long formant deux inclusions de iACC avec une chaine de magnétosomes prismatiques de magnétite. Toutefois, d'autres cellules avec des granules réfringents sous le microscope optique ont été observées dans les mêmes échantillons de sédiments et suggèrent une diversité importante qu'il reste à caractériser.

Dans ce contexte, le **Chapitre I** a pour objectif d'évaluer et classer la diversité phénotypique, minéralogique et taxonomique des $_{iACC}$MTB dans l'environnement dans lequel le premier morphotype avait été observé. Les observations faites au cours de ces trois années de thèse ont mis en évidence un grand groupe de MTB produisant des inclusions de carbonate de calcium rassemblant plusieurs espèces de *Pseudomonadota* avec des morphotypes différents ainsi que deux grandes classes de métabolisme.

1. Observation et quantification des populations de $_{iACC}$MTB dans le sédiment et la colonne d'eau

1.1. Exploration des communautés de MTB dans les sédiments et visualisation des $_{iACC}$MTB

Les bactéries magnétotactiques sont extrêmement diverses d'un point de vue de leur mobilité et leur ultrastructure (cf. synthèse bibliographique). Beaucoup de ces traits comme la présence d'inclusions aux différentes propriétés réfractives, tailles ou organisation, sont distinguables sous le microscope optique (MO). On peut donc se servir de ces critères pour définir des groupes ou des morphotypes de bactéries que l'on peut identifier et retrouver lors de chaque observation.

Faisant suite à plusieurs explorations avant le début de ma thèse, j'ai participé à plusieurs campagnes d'échantillonnage entre 2021 et 2023, durant lesquelles j'ai observé les communautés de MTB dans les sédiments superficiels du bord du lac Pavin situés entre 10 cm et 1 m de profondeur. Comme décrit dans l'article Monteil et al., (2021), et suivant les approches de concentration magnétique que j'ai présentées précédemment, les observations *ex-situ* au microscope optique d'échantillons de sédiments frais lors de ces campagnes d'échantillonnage ont permis de constater systématiquement une densité importante de MTB (~ 10^6 cellules/mL en fonction des échantillons) ainsi qu'une diversité riche de morphologies (e.g. spirilla, nanococcus, coccus, bâtonnets vibrios) dont certaines bactéries contenaient des inclusions très réfringentes sous le MO (**Figure 67**).

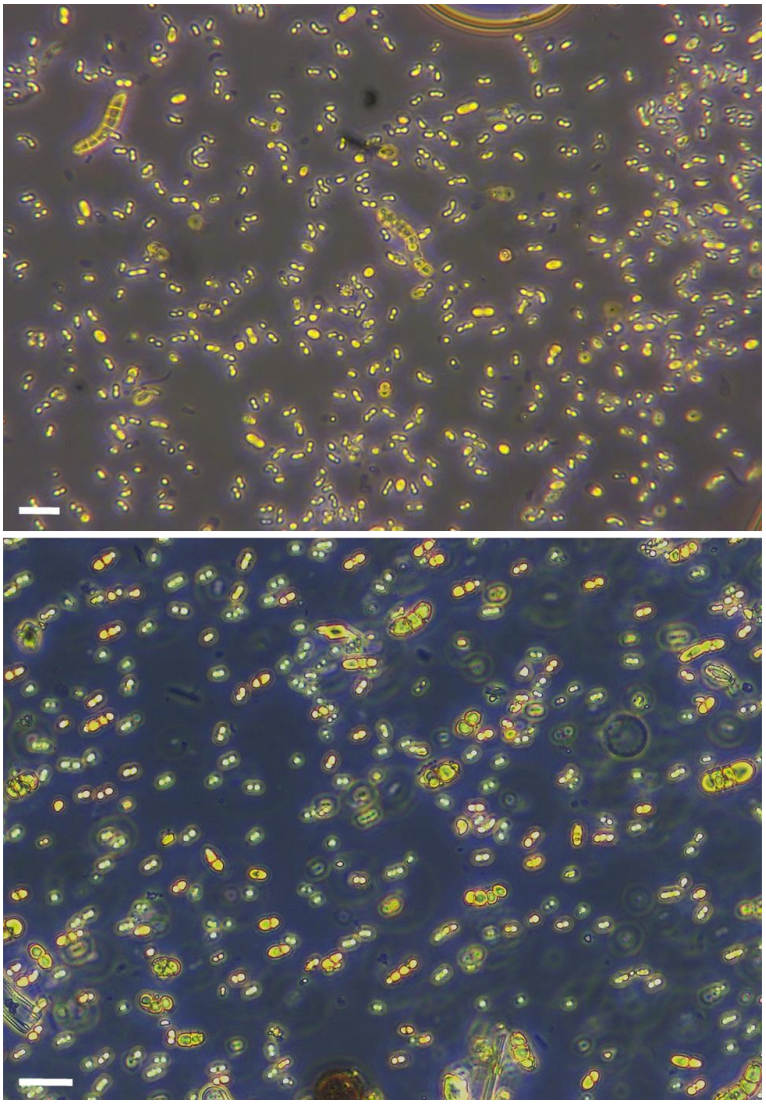


Figure 67 : Images de microscopie optique (MO) illustrant la diversité des populations de MTB formant des inclusions très réfringentes (semblables aux granules d'iACC) dans les sédiments peu profonds du lac Pavin (10 cm – 1 m). Les barres d'échelle (en blanc) représentent 10 µm.

La majorité des communautés était représentée par des bactéries de type coccus (i.e. de forme ronde), tout comme celles présentes au niveau de l'OATZ de la colonne d'eau (Bidaud et al., 2022). En plus des populations de cocci magnétotactiques (MTBc), il est important de souligner la présence d'une proportion importante (~ 10^3-10^4 cellules/mL en fonction des échantillons) et diversité d'autres MTB notamment des bâtonnets (généralement associés à des sulfatoréductrices), des spirilles (généralement des *Desulfovibrio* et *Magnetospirillum* spp.) ou des cocci nanométriques jamais caractérisés (possiblement des *Omnitrophota*). Les premiers centimètres du sédiment du lac Pavin abritent également une diversité importante d'autres communautés microbiennes non magnétotactiques facilement identifiables au MO notamment (i) des bactéries de type *Achromatium sp.,* (**Figure 68**) facilement distinguable par sa grande taille, sa faible motilité, ses énormes granules d'iACC et ses nombreux granules de soufre (Benzerara et al., 2021), (ii) des bactéries très allongées et formant des granules intracellulaires de

petite taille avec un contraste similaire aux granules de soufre suggérant qu'il pourrait s'agir de bactéries sulfureuses affiliées aux genre *Beggiatoa* (**Figure 68**) et *Thiospira*, (iii) ainsi que de nombreuses communautés planctoniques de microeucaryotes très diverses (e.g diatomées, ciliés, euglènes).

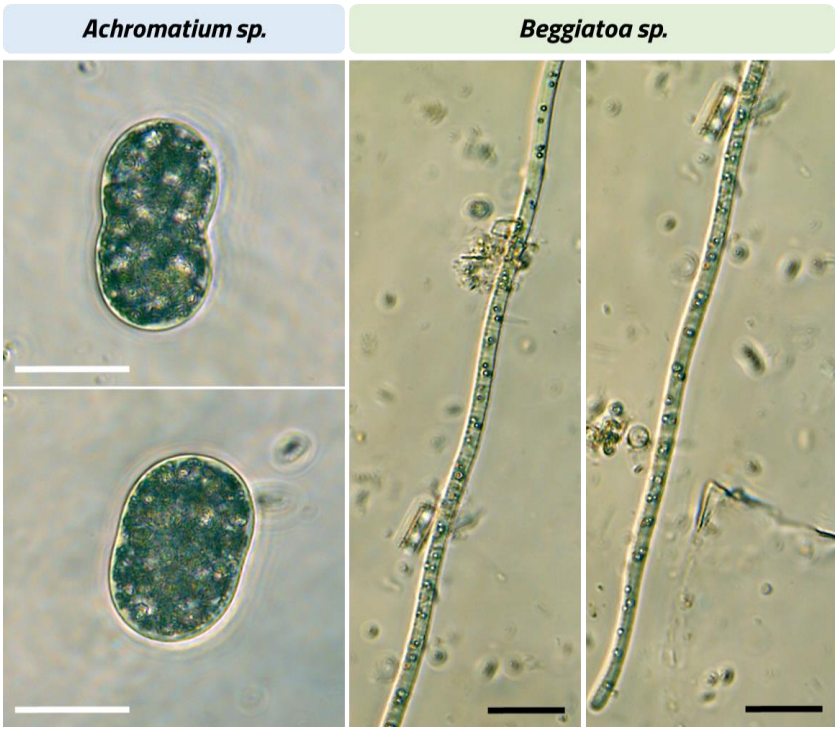


Figure 68 : Images de microscopie optique (MO) illustrant la diversité des autres communautés microbiennes non magnétotactiques dans les sédiments peu profonds du lac Pavin (10 cm – 1 m) notamment des bactéries de type *Achromatium* et des bactéries très allongées formant des granules intracellulaires de type *Beggiatoa*. Les barres d'échelle en blanc représentent 15 µm et celles en noir 10 µm.

Bien que les communautés de MTB auraient méritées une étude approfondie dans chaque site de prélèvement tellement elles étaient diverses, je me suis focalisée sur la recherche de cellules avec des inclusions intracellulaires d'ACC. Ces inclusions **sont grosses et très réfringentes** à la lumière du MO, une caractéristique morphologique qui s'est avérée être le **critère majeur permettant de facilement discriminer les $_{iACC}$MTB des autres bactéries**. De plus, au lieu de s'agréger au bord de la goutte, comme la plupart des MTB, ces bactéries sont constamment en mouvement : certaines ont un mouvement de va et vient ou "mouvement de ping-pong" (Rodgers et al., 1990). Parmi elles, certaines $_{iACC}$MTB, celles de taille importante (>10 µm), se déplaçaient verticalement le long de la goutte suspendue contrairement aux autres MTB. Une modification de notre méthode d'observation a été nécessaire afin de les observer, i.e. observation à faible grossissement pour pouvoir faire les observations à l'intérieur de la goutte sur une longue distance focale. Tous ces traits phénotypiques (i.e. granules très réfringents) et comportementaux (i.e. cellules magnétoréceptives) très spécifiques nous ont permis d'effectuer un premier tri des populations.

Ces observations au MO ont permis de définir des groupes de iACCMTB-*like*, « *like* » car la nature des inclusions réfringentes nécessitait d'être validée à ce stade. Plusieurs iACCMTB-*like* aux morphologies et tailles très variées, comportements magnétiques et des nages diverses, étaient observées de manière régulière dans les sédiments peu profonds peu importe la saison. Toutes avaient une caractéristique commune : la présence de granules très réfringents, de même contraste, sous le microscope. **Nous avons fait l'hypothèse que ces granules étaient également composés de phases carbonatées, comme les populations de iACCMTB déjà décrites au même endroit.** Afin d'optimiser leur concentration, nous avons utilisé un temps de concentration magnétique plus long (entre 3 et 4h) que ce qui est généralement appliqué. Ce choix est justifié notamment par la lenteur de nage de certaines populations. Nous avons ainsi étudié les populations de iACCMTB-*like* majoritaires afin de les caractériser et d'analyser leur biologie à travers l'analyse de leurs génomes.

1.2. Quantification des populations de iACCMTB dans les sédiments

L'abondance des différentes populations de iACCMTB dans leur milieu naturel a été estimée à partir de comptages effectués lors de la campagne **Mx70**. Pour ces comptages, nous avons prélevés des carottes de sédiments avec des seringues de 50 mL. En effet, le maintien de l'intégrité du sédiment est important pour rapporter un nombre de cellules à un volume de sédiment ou d'eau interstitielle sur les quelques centimètres de sédiment superficiels.

Les MTB formant des granules réfringents au MO ont été comptées dans les sédiments collectés au niveau de trois sites de prélèvement **LP1**, **LP2** et **LP3,** sélectionnés pour intégrer une hétérogénéité spatiale. Ces comptages ont confirmé l'ubiquité des iACCMTB-*like* dans les sédiments du lac et leur abondance importante, pouvant compter entre **2,1 x 10^3** jusqu'à **3,8 x 10^3 cellules/mL** (**Figure 69**) dans les populations de MTB tous sites confondus (cf. méthodologies, **Figure 56**). Toutefois, cette quantification a probablement été sous-estimée car la technique de la goutte suspendue utilisée a probablement faussé le comptage de ces MTB.

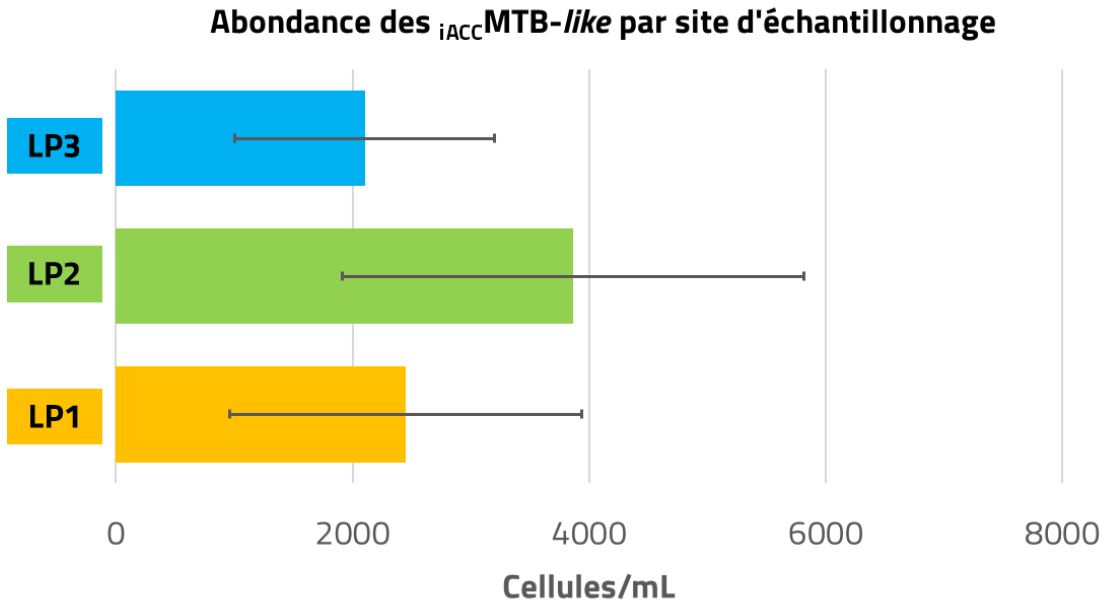


Figure 69 : **Quantification des populations de iACCMTB-*like* dans les sédiments peu profonds du lac Pavin**. Abondance des cellules de iACCMTB-*like* (nombre de cellules/mL ~ nombre de cellules/cm^3) dans les sites LP1, LP2 et LP3. Les comptages ont été effectués en triplicata. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types.

Si la quantification de l'abondance des iACCMTB dans la colonne d'eau est facilitée par la largeur de l'OATZ, celle dans les sédiments est plus difficile car il nécessite de déterminer le volume d'eau interstitiel spécifique de la zone OATZ qui s'étend sur quelques millimètres seulement. Plusieurs carottages effectués avec des seringues de 50 mL au niveau de plusieurs sites (**Figure 69**) ont permis de réaliser une estimation de cette abondance.

1.3. Quantification des populations de iACCMTB dans la colonne d'eau

Mon travail de thèse s'est principalement focalisé sur les sédiments car les populations de iACCMTB y sont abondantes et nous arrivons à conserver les populations dans des microcosmes plusieurs mois. Cependant, Monteil et al., (2021) décrivaient également un groupe de iACCMTB dans la zone anoxique juste en dessous de l'OATZ de la colonne d'eau semblant partager des traits communs avec ceux du sédiment. Une quantification de ces populations a été réalisée lors de plusieurs missions durant la thèse afin d'étudier plus finement l'environnement géochimique. Les résultats sur l'étude de la niche écologique des iACCMTB sont présentés dans le troisième chapitre (cf. Chapitre III).

Plusieurs échantillonnages réalisés en collaboration avec l'équipe ont confirmé les observations de Bidaud et al., (2022) : les communautés de MTB sont localisées dans la zone anoxique juste en dessous de l'OATZ et sont **dominées par les cocci magnétotactiques MTBc** (**Figure 70**) qui représentent > 95% des cellules. **La diversité générale est bien inférieure dans la colonne d'eau comparée à celle du sédiment** ;

plusieurs populations observées dans le sédiment n'ont pas été retrouvées dans la colonne d'eau, suggérant des niches écologiques différentes.

Les maximums d'abondance des MTBc et celui des $_{iACC}$MTB ont été observés à différentes profondeurs en fonction de la saison (i.e. été versus automne) (**Figure 70**). En effet, durant l'été (**Figure 70A**) le maximum d'abondance de cocci magnétotactiques MTBc (~1,5 × 10^4 cellules/mL) et celui des $_{iACC}$MTB (~ 5 × 10^3 cellules/mL) ont été mesurés à une même profondeur de 56 m. En revanche, deux pics de distribution distincts ont été observés en automne (**Figure 70B**) avec un maximum d'abondance des MTBc moins profond (autour de 52 m et autour de 1,5 × 10^4 cellules/mL) comparé au pic d'abondance des $_{iACC}$MTB plus profond (autour de 55 m et avec une concentration de 2 × 10^3 cellules/mL).

A noter que nous avons été surpris d'observer aucune $_{iACC}$MTB dans la colonne d'eau lors de certaines campagnes comme celle de la mission **Mx68** (Avril 2022) (cf. Chapitre III). Ce type d'observation a été réalisé systématiquement après ou pendant une intempérie, ce qui nous a amenés à faire l'hypothèse que les populations de $_{iACC}$MTB sont très sensibles aux perturbations des gradients chimiques. Mais il est également possible que face à des conditions environnementales perturbées, les $_{iACC}$MTB soient localisées ailleurs dans la colonne d'eau et / ou ne sont transitoirement pas magnétotactiques et donc, indétectables.

La caractérisation des populations de $_{iACC}$MTB de la colonne d'eau n'a pas pu être aussi approfondie que celle des populations du sédiment car une fois les échantillons d'eau ramenés au laboratoire, le temps de survie des cellules était d'une semaine.

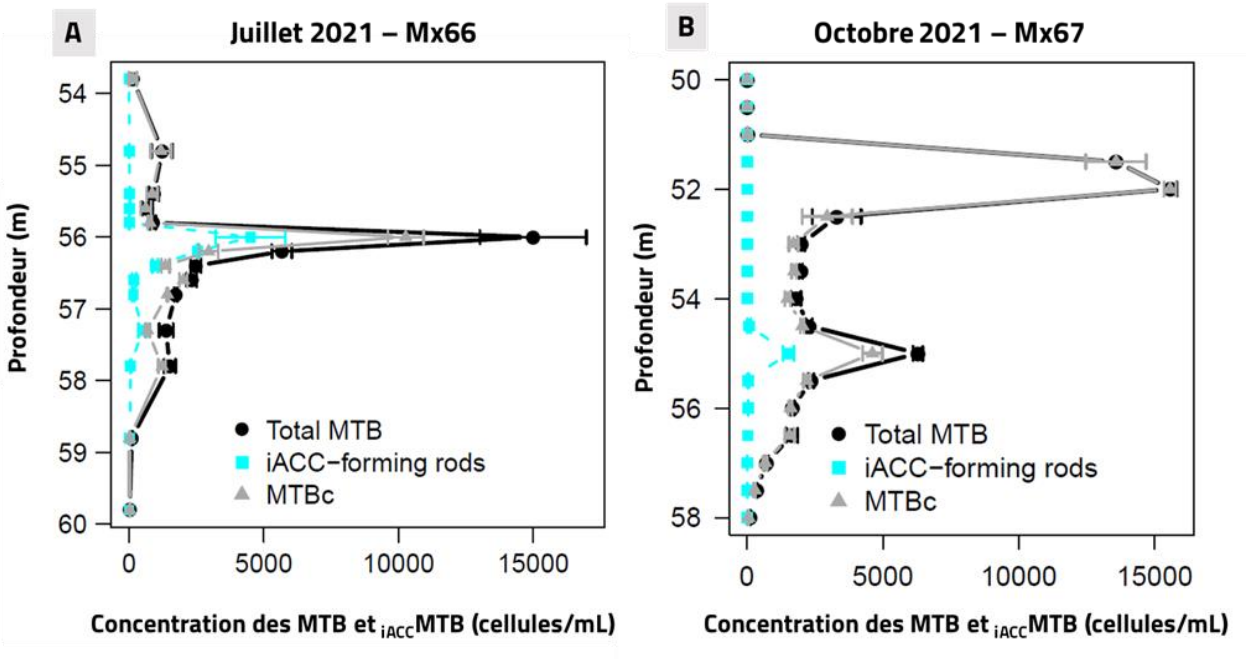


Figure 70 : **Distribution saisonnière et stratification verticale des différentes populations de MTB en fonction de la profondeur de la colonne d'eau du lac Pavin.** Les profils verticaux ont été réalisés lors des missions (A) de l'été 2021 et (B) de l'automne 2021.

2. Classification des populations de iACCMTB

Nous avons fait le choix d'adopter une approche de micromanipulation de cellule unique pour caractériser les iACCMTB-*like* majoritaires du lac Pavin. C'est l'approche qui s'est révélée la plus adaptée pour relier un phénotype à un contenu génétique alors que nous ne savions pas cultiver ce groupe de bactéries. Afin de communiquer sur la diversité et de pouvoir associer un phénotype/minéralogie à un groupe d'espèces, nous avons mis en place une **stratégie de classification répartie en plusieurs niveaux d'analyses** (**Figure 71**)**.** Pour commencer, nous avons classé les populations triées au micromanipulateur sur la base de leur morphologie, taille, comportement magnétique et de leur nage sous le microscope optique. Puis l'utilisation de la microscopie électronique à balayage ou en transmission, de la spectroscopie et de techniques de biologie moléculaire nous a permis de faire une discrimination plus fine des différentes iACCMTB (**Figure 71**). Ce travail a été possible grâce à plusieurs collaborations au sein de l'équipe, avec le LABGeM (Genoscope, Evry), l'IPGP et l'IMPMC (Sorbonne Université, Paris), car une telle caractérisation nécessite plusieurs expertises dont celles en microbiologie/écologie des MTB, minéralogie, sciences environnementales, génomique et biologie évolutive.

Cette classification est faite de la manière suivante :

(1) Deux MTB possédant des caractéristiques phénotypiques (e.g. taille, forme, mobilité) et minéralogiques (i.e. magnétosomes et inclusions d'iACC) sont assignées à une population partageant le même « **morphotype** », **i.e. l'ensemble des caractères**

morphologiques et physiques héritables d'un individu. Chronologiquement, les morphotypes ont d'abord été définis à travers les caractères observables et comportementaux visualisés à l'aide de la microscopie (MO, MET et MEB).

(2) Dans un second temps, la diversité minéralogique a été explorée à travers l'analyse de la composition chimique des minéraux, leur structure à l'aide de la microscopie couplée à la spectroscopie (STEM-XEDS et HR-TEM).

Cette première étape constitue un premier niveau de classification. Nous avons vu précédemment que deux cellules partageant le même morphotype pouvaient possiblement appartenir à plusieurs espèces/genres/familles, mais que deux cellules aux morphotypes différents ne pouvaient très probablement pas appartenir à la même espèce/genre/famille.

(3) La diversité taxonomique des cellules classées par morphotype a ensuite été explorée en amplifiant le gène codant pour l'ARNr 16S. Les cellules micromanipulées ont été regroupées en OTUs.

(4) Les cellules micromanipulées ont été regroupées en espèces génomiques en utilisant les génomes complets *via* les analyses de phylogénie moléculaire.

(5) Enfin, plusieurs séquençages de génomes représentant la diversité de iACCMTB observée ont été réalisés afin de reconstruire des génomes les plus complets possibles. Une annotation fonctionnelle a été réalisée et les réseaux métaboliques ont été reconstruits afin de trouver les bases fonctionnelles à l'origine de la formation des carbonates dans les différents groupes.

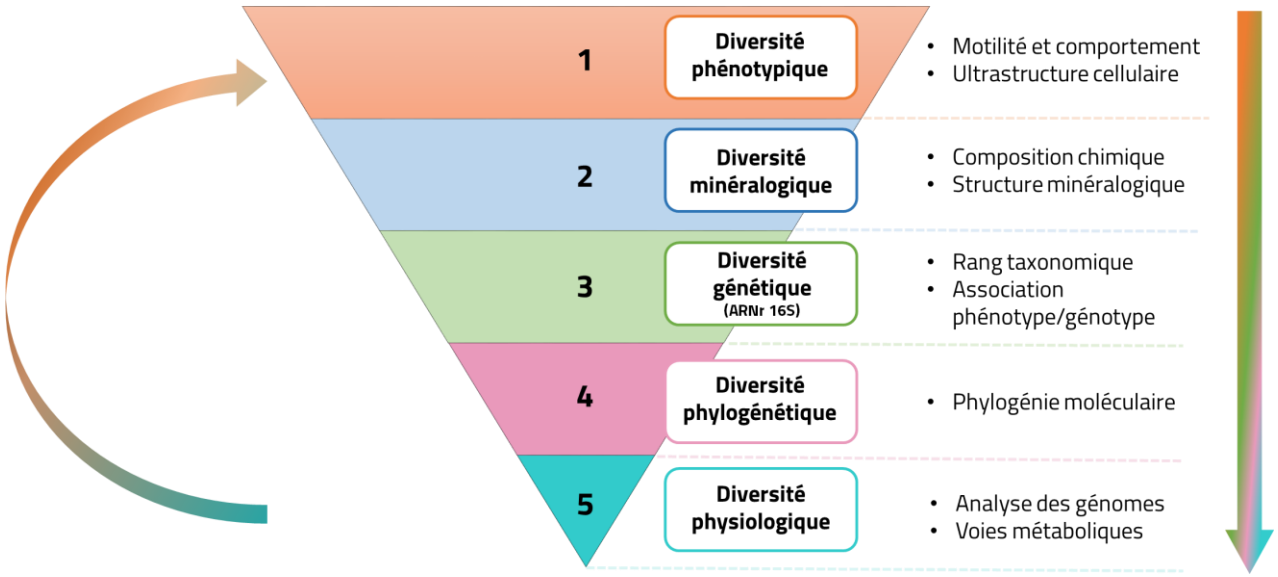


Figure 71 : Représentation schématique de la stratégie de classification mise au point dans cette thèse pour étudier la diversité des populations de iACCMTB. Le classement des morphotypes de iACCMTB est représenté en 5 niveaux.

3. Etude de la diversité des morphotypes de iACCMTB-*like* dans le sédiment

3.1. Observation de différents morphotypes

Après avoir analysé plus de 200 échantillons de sédiments peu profonds au cours des 3 dernières années, j'ai réalisé une estimation du nombre de morphotypes représentés dans les populations de iACCMTB dans le sédiment. Sur la base des observations en MO, j'ai différencié plus d'une dizaine de morphologies (**Figure 72**) avec des caractéristiques très différentes (i.e. taille, nage, nombre d'inclusions réfringentes).

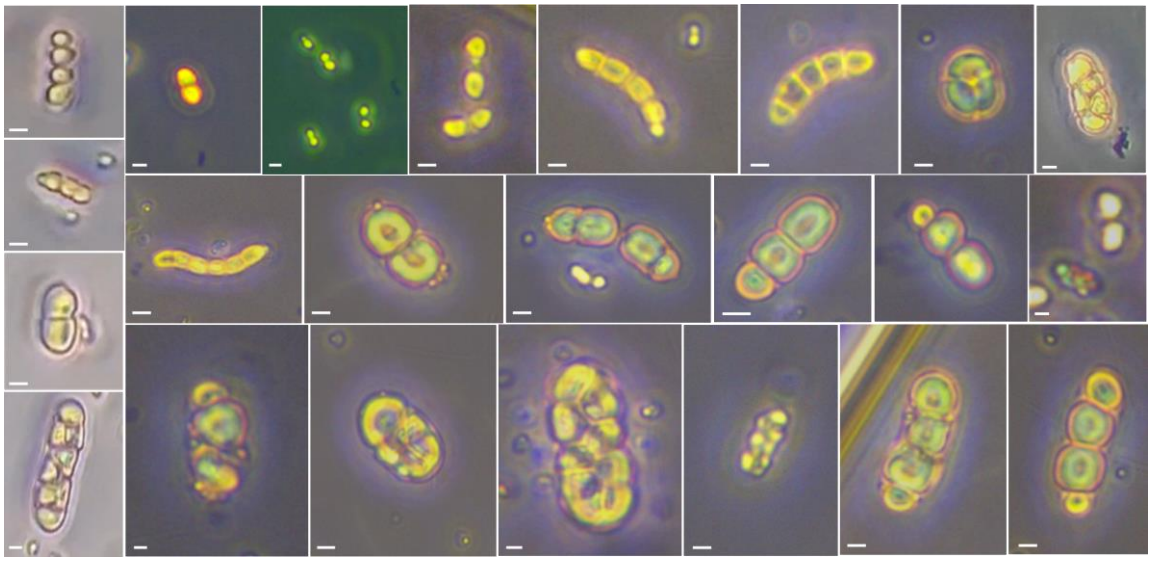


Figure 72 : Diversité morphologique et de taille des populations de iACCMTB-like dans les sédiments du lac Pavin. Images de microscopie optique (MO) des différents morphotypes de iACCMTB-like dans les sédiments peu profonds (10 cm – 1 m). Les barres d'échelle représentent 1 µm.

Tous ces morphotypes n'étaient pas systématiquement observables dans tous les échantillons et en abondance suffisante pour permettre de caractériser toutes les populations de iACCMTB d'un point de vue génétique ou minéralogique. D'autre part, il n'a pas toujours été évident d'évaluer si certains morphotypes représentaient deux espèces différentes ou bien deux stades de croissance pour une même espèce (e.g. cellule avec 2 inclusions vs cellule avec 4 inclusions).

Malgré cela, nous avons mis en évidence **4 morphotypes dominants au sein des populations de iACCMTB, qui ont été systématiquement observés à chaque échantillonnage, à toute saison, dans tous les sites**, mais avec des fréquences relatives variables (**Figure 73A et B**). Parmi eux, on retrouve le premier morphotype (morphotype #1) décrit par Monteil et al., (2021) représentant la grande majorité des iACCMTB (a minima 80% et dans certains échantillons jusqu'à 100%). Mais 3 autres morphotypes ont régulièrement été observés et ont fait l'objet d'une étude approfondie durant ma thèse**.** La fréquence relative de chaque morphotype est différente à chaque site. A l'exception du morphotype 1 partiellement caractérisé par Monteil *et al.*, (2021) qui est très abondant dans tous les sites échantillonnés **LP1**, **LP2** et **LP3** (**Figure 73B**), les autres morphotypes sont très peu abondants, sans concentration magnétique ces morphotypes n'auraient jamais pu être caractérisés. Ces 4 morphotypes représentaient entre 95 et 100% des iACCMTB-*like* totaux dans les sédiments peu profonds du lac Pavin.

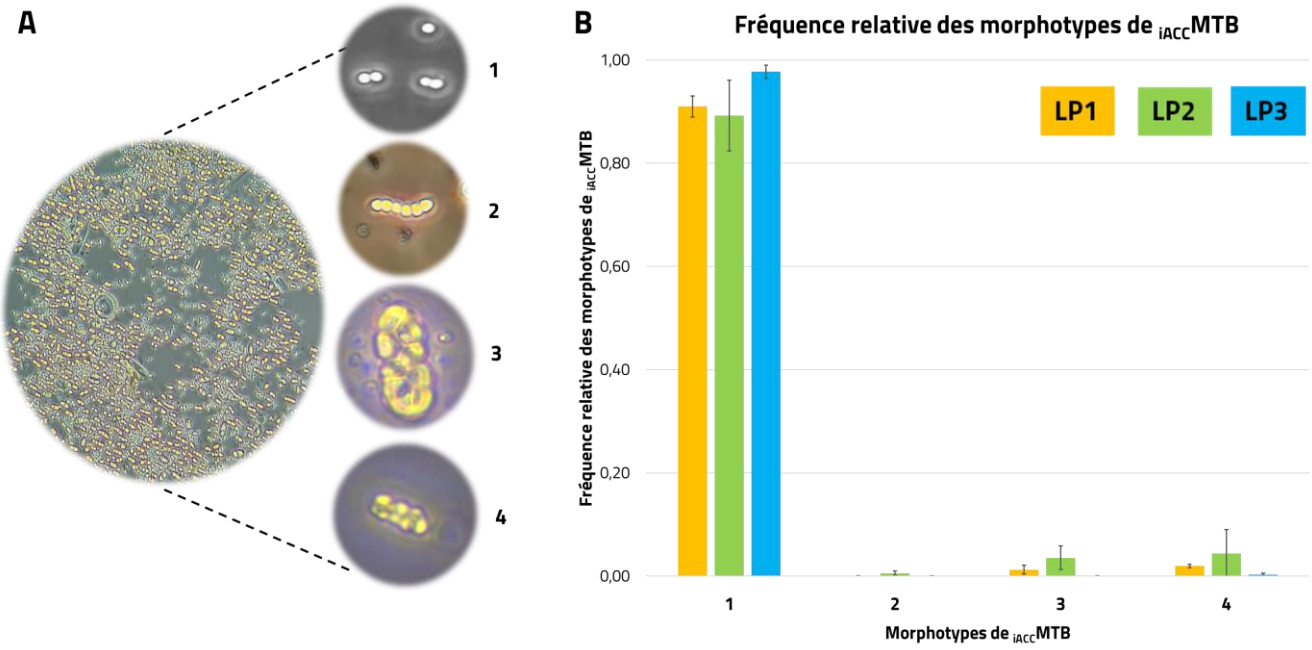


Figure 73 : **Diversité morphologique et fréquence relative des 4 morphotypes de iACCMTB-*like* les plus abondants et observés de façon reproductible dans les sédiments peu profonds du lac Pavin.** A) Images de microscopie optique des différents morphotypes de iACCMTB-like dans les sédiments du bord. B) Distribution des populations de iACCMTB-*like* par morphotype dans les sédiments du bord (sites échantillonnés LP1, LP2 et LP3). Les valeurs d'abondance moyenne de chaque population ont été converties en abondance relative (fréquence relative) afin de comparer l'abondance d'un morphotype par rapport à celle d'un autre. Les comptages ont été effectués en triplicata lors de la campagne d'échantillonnage Mx70. Les écart-types ont été calculés pour chaque variable.

La **nage et le comportement** en bord de goutte suspendue font partie des caractères observés au MO, spécifiques pour chaque population / morphotype de MTB. En effet, les populations appartenant au **morphotype 1** ont une **nage hélicoïdale** plus au moins rapide et ont tendance à rester au fond de la goutte et à s'agréger plus rarement en bord de goutte avec les autres MTB, tandis que celles appartenant au **morphotype 2** ont une **nage ondulatoire** très rapide avec la particularité de réaliser des mouvements de va-et-vient au bord de la goutte suspendue (i.e. « ***ping pong motion*** » (Rodgers et al., 1990)). Ce mouvement est possiblement lié à un chimiotactisme spécifique : la magnétotaxie contraint la cellule à rejoindre le bord de goutte (en direction du pôle sud de l'aimant) ; toutefois le bord de goutte est certainement plus oxygéné, ou plus chimiquement contraignant, et peut être répulsif pour la cellule. Les populations associées au **morphotype 3** ont une **nage lente** (expliquée probablement par sa taille volumineuse) et **hélicoïdale**, et se déplacent entre le bord de la goutte et le fond de la goutte mais la majorité des cellules restent au fond de la goutte. Enfin, les cellules regroupées sous le **morphotype 4** se distinguent des autres par une **nage très rapide** vers le bord de goutte avec un mouvement **hélicoïdal**, et peuvent avoir tendance à s'agréger sur le bord de goutte avec les autres MTB. Pour toutes les étapes de caractérisation de ces populations, le pôle sud de l'aimant était systématiquement positionné en direction du microcosme à analyser (attraction des bactéries nageant vers le Nord), car la plupart des 4 morphotypes sont exclusivement *North-seeking*. Toutefois, les cellules associées au morphotype 1 et au morphotype 2 ont souvent été observées ayant également l'autre polarité, i.e. *South-seeking* (attirées par le nord de l'aimant) en plus faible nombre.

Nous avons émis l'hypothèse que ces nouveaux morphotypes dans les sédiments peu profonds du bord (i.e. morphotype 2, 3 et 4) biominéralisent des organites intracellulaires d'ACC semblables à ceux du morphotype 1, en raison (i) du caractère réfringent et très dense aux électrons des inclusions sous le MO et le MET, respectivement et (ii) de leur coexistence avec les populations de $_{iACC}$MTB déjà décrites (morphotype 1). Les sections suivantes présentent les analyses ultrastructurales des principaux morphotypes présentés dans la **Figure 73A**, notamment des images de MEB pour valider la présence de carbonate et calcium dans les inclusions. Chacun des morphotypes est également décrit (e.g. ultrastructure, motilité, magnétosomes, type d'inclusions).

3.2. Ultrastructure des morphotypes dominants

3.2.1. Morphologie, nage et inclusions

Les observations de MO évoquaient des traits physiques distincts pour chaque morphotype, notamment sur la **taille (longueur/largeur)** (i.e. morphotype 1 (*n = 33*), morphotype 2 (*n = 48*), morphotype 3 (*n = 20*), morphotype 4 (*n = 39*)) et le **nombre d'inclusions** (i.e. morphotype 1 (n = *94*), morphotype 2 (n = *107*), morphotype 3 (n = *32*), et morphotype 4 (n = *103*). « n » représente le nombre de cellules comptées. Nous avons

également effectué des observations au MET et au MEB pour étudier la forme et la répartition des magnétosomes dans la cellule ainsi que le reste de l'ultrastructure cellulaire (**Figure 74**).

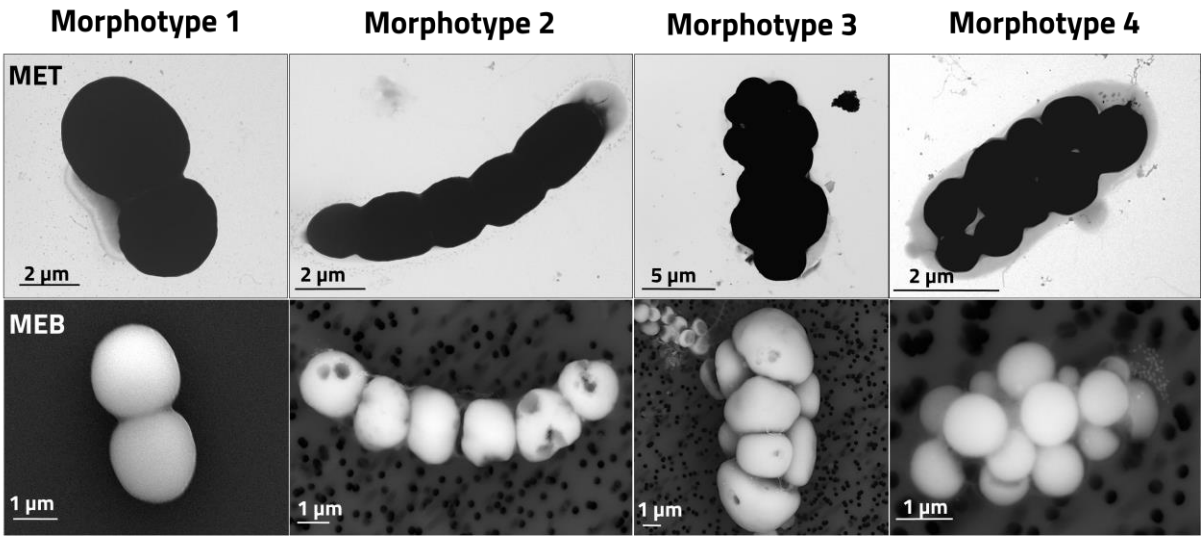


Figure 74 : **Images de MET et de MEB des principaux morphotypes de MTB formant des inclusions occupant la majeure partie de leur volume cellulaire**. Ces inclusions très denses aux électrons ont un contraste différent et apparaissent en noir au MET et en blanc au MEB. Ces images montrent les différences d'ultrastructure entre les quatre morphotypes et confirment nos observations en MO.

L'ensemble de ces descripteurs (i.e. taille, morphologie, motilité, magnétosomes, inclusions de carbonate) sont très différents suivant le morphotype, comme le résume la **Figure 75**. On constate des différences significatives concernant la taille des cellules. Les cellules classées sous le morphotype 1 ont une morphologie de bâtonnet mesurant 4,2 (± 0,5) µm de longueur et 1,8 (± 0,3) µm de largeur. Les mesures montrent que les cellules classées dans le morphotype 2 se distinguent bien du morphotype 1 et peuvent présenter une longueur trois fois plus grande en moyenne (12,3 ± 1,9 µm) et une largeur deux fois plus importante (2,4 ± 0,3 µm). Les cellules du morphotype 3 se démarquent de tous les autres morphotypes par leur taille conséquente avec une longueur et une largeur moyenne de 15,3 (± 1,7) µm et 6,7 (± 0,8) µm, respectivement. Enfin, les bactéries appartenant au morphotype 4 se rapprochent du premier en terme de taille avec une longueur et largeur moyenne de 5,0 (± 1) µm et 2,0 (± 0,3) µm, respectivement (**Figure 75**).

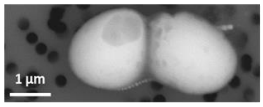
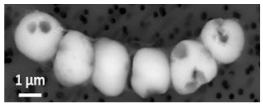
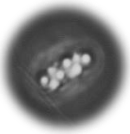
			Cellule		Inclusion	
			Longueur (µm)	Largeur (µm)	Diamètre (µm)	Nombre (par cellule)
Morphotype 1			4,2 ± 0,5	1,8 ± 0,3	1,22 ± 0,17	[2:4]
Morphotype 2			12,3 ± 1,9	2,4 ± 0,3	2,3 ± 0,3	[5:12]
Morphotype 3			15,3 ± 1,7	6,7 ± 0,8	[3,0:6,2]	[5:10]
Morphotype 4			5 ± 0,9	2 ± 0,3	0,85 ± 0,16	[10:18]

Figure 75 : **Statistiques descriptives obtenues à partir de mesures de taille des cellules, et de taille et nombre d'inclusions effectuées sur les cellules les plus représentatives de chaque morphotype de $_{iACC}$MTB-like (morphotypes 1 à 4).** Des images de MO et de MEB d'une cellule sont organisées verticalement, représentant chacun un des quatre morphotypes. Plusieurs cellules ont été utilisées pour les mesures de la taille cellulaire (longueur (µm) et la largeur (µm)) : morphotype 1 (*n = 33*), morphotype 2 (*n = 48*), morphotype 3 (*n = 20*), morphotype 4 (*n = 39*). Le diamètre (µm) et le nombre d'inclusions par cellule ont été déterminés pour le morphotype 1 (n = *94*), morphotype 2 (n = *107*), morphotype 3 (n = *32*), et morphotype 4 (n = *103*). Les valeurs entre crochets correspondent à un intervalle du nombre d'inclusions/cellule allant de la plus petite à la plus grande valeur.

Le **nombre d'inclusions** formées par la cellule est également un trait variant d'un morphotype à un autre (**Figure 75**) allant de 2 à 18. Les cellules classées sous le morphotype 1 peuvent former des inclusions alignées le long de l'axe antéro-postérieur mesurant 1,22 (± 0,17) µm, tandis que celles du morphotype 2 peuvent en avoir entre 5 et 12 mesurant 2,3 (± 0,3) µm. Les bactéries du morphotype 3 présentent la particularité de posséder de larges inclusions imbriquées les unes avec les autres (similaire aux inclusions d'*Achromatium* sp.), et dont la forme n'est pas aussi sphérique que celles des autres morphotypes. Cet arrangement particulier rend difficile leur comptage ; certaines cellules peuvent avoir entre 5 et 10 grosses inclusions, la plus petite pouvant mesurer 3 µm et la plus grande 6,2 µm (**Figure 75**). Enfin, les cellules du morphotype 4 peuvent former entre 10 et 18 petites inclusions sphériques de $CaCO_3$ ayant un diamètre moyen de 0,85 (± 0,16) µm.

Nous avons essayé de réaliser des inclusions des différents morphotypes dans de la résine pour la réalisation de coupes fines afin de visualiser la localisation exacte des inclusions ainsi qu'une éventuelle enveloppe autour des iACC des populations de $_{iACC}$MTB (**Figure 76**). Néanmoins, ces techniques nécessitent une biomasse importante et celle des populations des morphotypes 2 et 4 n'étant pas assez importante, de telles analyses n'ont pas été possibles malgré plusieurs essais.

Récemment, nous avons observé un microcosme enrichi en cellule du morphotype 3 de iACCMTB. Un échantillon prélevé au site LP2 (le 22 juillet 2022 durant la mission Mx70), observé un an après présentait une forte abondance de MTBc et du morphotype 3. Les culots formés par ces MTB lors des concentrations magnétiques étaient suffisamment volumineux pour permettre d'inclure ces cellules dans de la résine. Les observations des coupes fines réalisées ont permis de montrer que les iACC du morphotype 3 sont localisées dans des vésicules formées par une double membrane (**Figure 76**). Ces coupes fines nous ont également permis de montrer la double membrane cellulaire typique des bactéries à Gram négatif (**Figure 76C**), la membrane entourant les cristaux des magnétosomes (**Figure 76D**) et la présence de structures à la surface de la cellule pouvant correspondre à des exopolysaccarides (**Figure 76**). Une double membrane autour des inclusions d'ACC avait également été mise en évidence pour les MTB du morphotype 1 (Monteil et al., 2021).

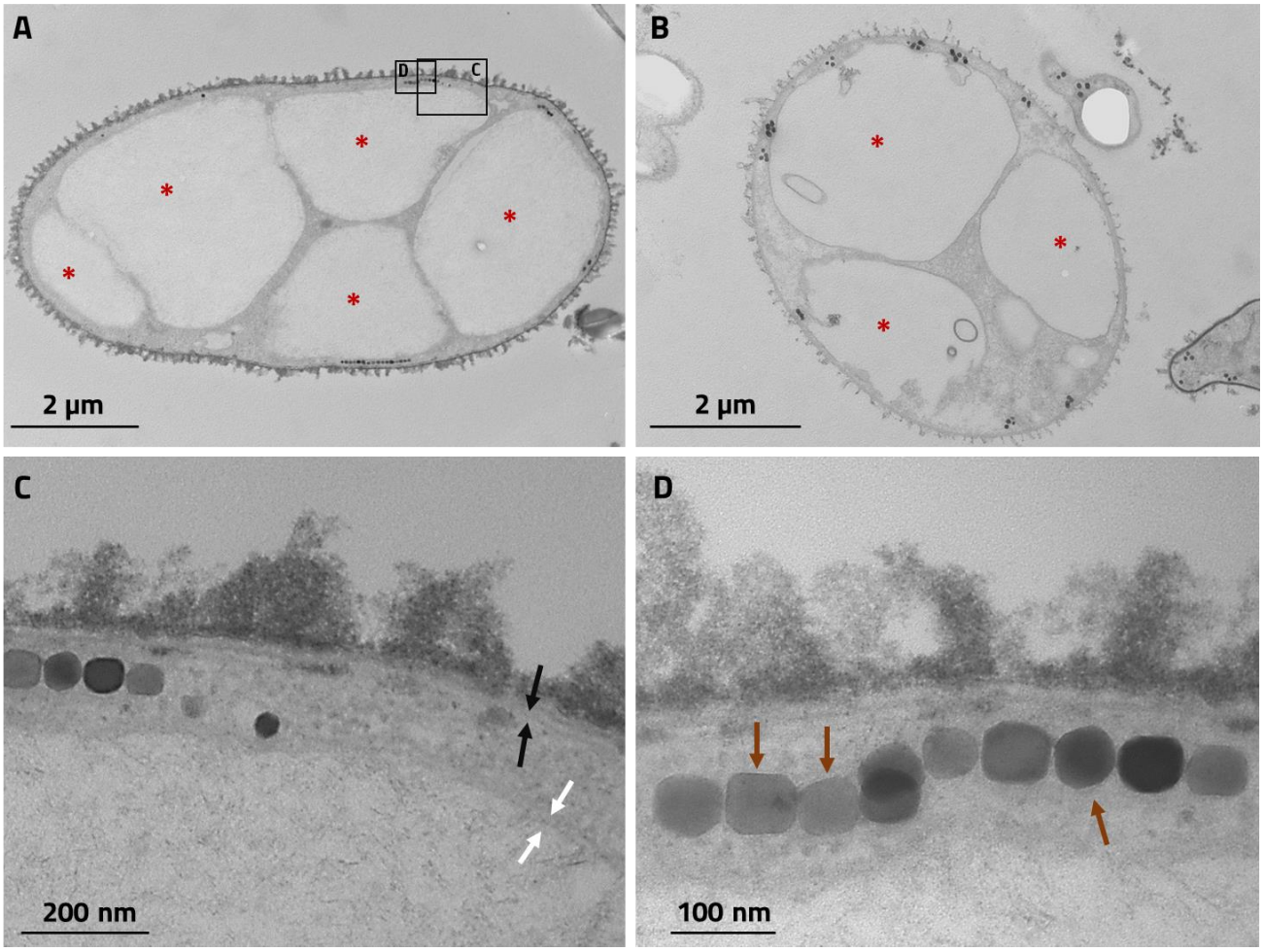


Figure 76 : **Observations MET de coupes fines du morphotype 3 de MTB produisant des iACC.** A) Images d'une cellule en coupe fine longitudinale et B) d'une autre cellule en coupe fine transversale. Les grandes inclusions d'ACC, représentées par des étoiles rouges, ont été perdues au cours de la préparation. C) et D) Images agrandies correspondant respectivement aux zones encadrées dans l'image (A). C) Image montrant la présence (i) d'une double membrane cellulaire typique des bactéries à Gram négatif, représentée par des flèches noires, (ii) d'une double membrane entourant les inclusions d'iACC, représentée par des flèches blanches. D) Image montrant la présence d'une membrane entourant les cristaux de magnétosomes, représentée par les flèches marrons.

L'ensemble des mesures ont été obtenues à partir de cellules les plus représentatives de chaque morphotype de iACCMTB. En effet, certaines observations et données indiquent une petite hétérogénéité en terme de taille des cellules, et de taille et nombre d'inclusions. Cette variabilité d'ultrastructure pourrait s'expliquer notamment par le fait que ces populations représentent plusieurs espèces avec des traits légèrement différents, des états physiologiques ou stades cellulaires et de division différents. Par exemple, bien que le **morphotype 1** regroupe majoritairement des cellules formant 2 inclusions, certaines cellules forment 4 inclusions dont 2 de plus petite taille au centre (**Figure 77**).

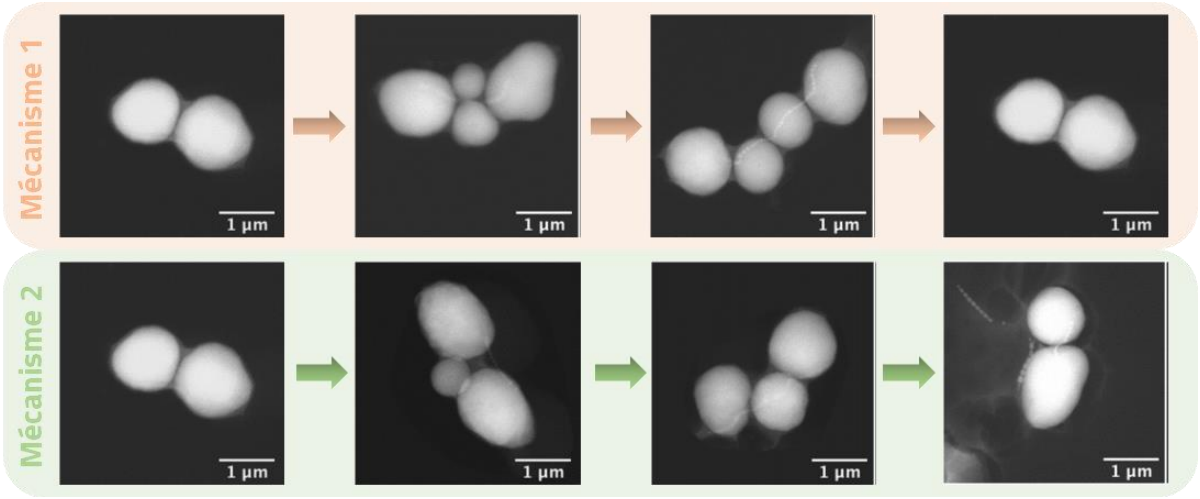


Figure 77 : **Mécanismes proposés pour la formation de nouvelles inclusions pour le morphotype 1 (Monteil *et al.* 2021).** Les auteurs supposent que la taille de l'inclusion est liée à l'étape de croissance. Mécanisme 1 (flèches oranges) : (i) deux petites inclusions se forment au niveau du septum, (ii) les nouvelles inclusions se développent et (iii) après la division cellulaire, les deux cellules filles contiennent 2 inclusions (e.g. une mature et une nouvellement formée). Mécanisme 2 (flèches vertes) : (i) une seule petite inclusion se forme au niveau du septum, (ii) la nouvelle inclusion unique se développe et (iii) après la division cellulaire, une seule cellule fille contient 2 inclusions (e.g. une mature et une nouvellement formée). Les cellules ont été observées à l'aide de l'imagerie STEM-HAADF. **Monteil *et al* (2021) Supplementary Information.**

Quant au **morphotype 2**, bien que presque l'essentiel des cellules peuvent former 5 inclusions, dans de rares cas, jusqu'à 12 inclusions ont été observées (**Figure 78**). Certaines des inclusions de petite taille sont situées aux extrémités de la cellule, indiquant probablement un schéma de croissance où les nouvelles inclusions se forment aux pôles (**Figure 78**). S'agissant du **morphotype 3** et du **morphotype 4**, les inclusions ne semblent pas suivre une organisation spécifique. En effet, les inclusions des cellules du **morphotype 4** ont une taille régulière appuyant l'hypothèse d'un contrôle de la cellule sur la taille de ses inclusions. En revanche, les cellules du **morphotype 3** ont la particularité de former des inclusions de tailles différentes mais ont tout de même une taille maximale ne dépassant rarement les 6 µm (**Figure 75**).

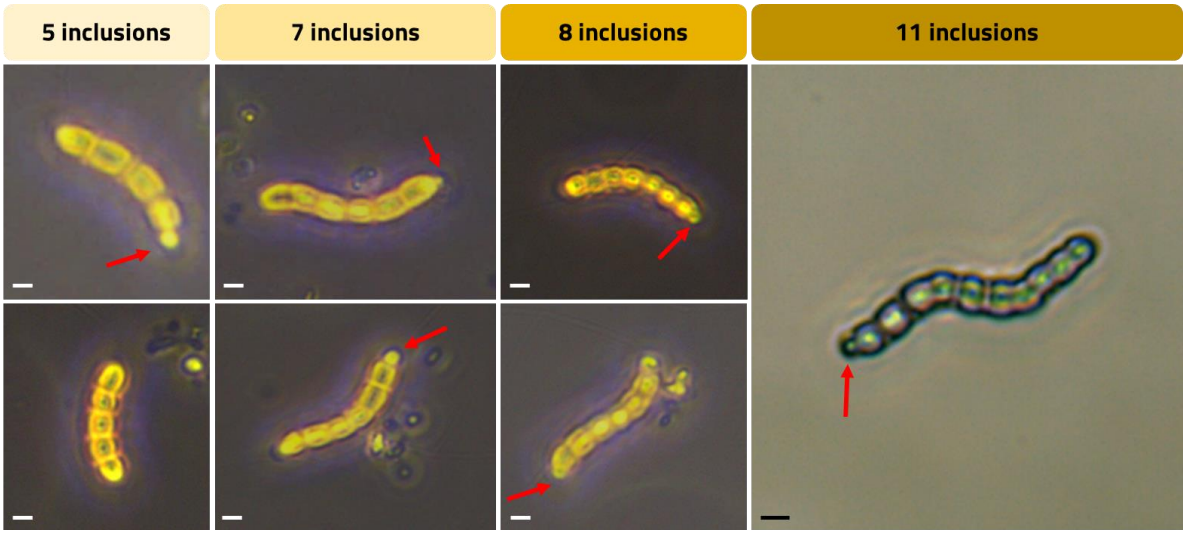


Figure 78 : **Images de microscopie optique (MO) montrant la diversité « sub-morphotypique » du morphotype 2.** Nous supposons que la taille de l'inclusion est liée à l'étape de croissance. La formation de nouvelles inclusions aux extrémités suggère un schéma de croissance où les nouvelles inclusions se forment aux pôles (contrairement au morphotype 1). Les flèches rouges indiquent les petites inclusions en cours de formation. Les barres d'échelles en blanc représentent 2 µm et la barre d'échelle en noir représente 3 µm.

La caractérisation des magnétosomes a fait l'objet d'une attention particulière car leur morphologie et leur organisation sont connues comme étant spécifiques à chaque espèce (Lefèvre et al., 2013a). **Chaque morphotype de iACCMTB-*like* semble être défini par la formation de magnétosomes avec une taille, une organisation, un nombre et une morphologie différents**. Par exemple, les MTB classées sous le morphotype 1 ont la particularité de former majoritairement des magnétosomes en forme de prisme rectangulaire mesurant 58 ± 4,0 nm de longueur et 40 ± 3,0 nm de largeur (*n = 242*) (**Figure 79**). A noter que nous avons observé, plus rarement, des cellules classées initialement dans le **morphotype 1** avec des magnétosomes de forme octaédrique. Suivant notre classification, elles représenteraient donc un autre morphotype et pourraient représenter une espèce génomique différente de celles composant les populations majoritaires. Etant donné la forme des magnétosomes, il est possible que les espèces de ce morphotype soient génétiquement plus proches de celles de la colonne d'eau ayant le même type de magnétosomes. Leur fréquence d'observation étant très faible l'existence de ces populations ne change pas les quantifications.

Les cellules du **morphotype 2** forment, quant à elles, des magnétosomes en forme de cuboctaèdre mesurant 78 ± 11 nm de longueur et 70 ± 10 nm de largeur (*n = 352*) (**Figure 79**). Bien que leur ultrastructure diverge, les MTB appartenant aux **morphotypes 3** et **4** ont la caractéristique commune de synthétiser des magnétosomes en forme de prisme allongé. Néanmoins, ces derniers biominéralisent des magnétosomes de longueurs différentes (63 ± 7,5 nm (*n = 212*) et 81 ± 8,8 (*n = 165*), respectivement) ainsi que des largeurs distinctes (46 ± 4,1 nm (*n = 212*) et 51 ± 6,3 (*n = 165*), respectivement) (**Figure 79**).

L'organisation des inclusions d'iACC et des magnétosomes semblent très différentes entre les morphotypes 1, 2, 3 et 4 (**Figure 80**). Les MTB associées au morphotype 1 synthétisent une seule chaîne de 10 à 20 magnétosomes, généralement organisée au centre de la cellule, tandis que les MTB du morphotype 2 forment un faisceau, en forme de « nid d'abeille », composé de 3 à 4 chaînes traversant toute la longueur de la cellule (pouvant contenir 160 à 350 magnétosomes) (**Figure 80**). L'agencement imbriqué des magnétosomes en nid d'abeille suggère une croissance en longueur et en largeur. En effet, il n'est pas rare d'observer des magnétosomes de petite taille aux extrémités et en milieu de chaine. Les cellules du morphotype 3 se démarquent des autres morphotypes par la formation d'un nombre très important de magnétosomes (jusqu'à 550 magnétosomes par cellule) (**Figure 80**) et produisent de nombreuses chaines de magnétosomes qui s'organisent généralement parallèlement à l'axe le plus long de la cellule mais avec des déformations probablement liées à la croissance des inclusions qui occupent la quasi-totalité de l'espace intracellulaire. Ces chaînes sont généralement observées à proximité de la membrane interne des cellules (**Figure 76**). Les MTB du morphotype 4 ont la particularité de synthétiser entre 10 et 30 magnétosomes désordonnés et agrégés au pôle de la cellule qui contient le flagelle (**Figure 80**). Cette organisation a déjà été observée chez certaines MTB de la famille des *Magnetoococcaceae* (Cox et al., 2002) et questionne sur l'efficacité de ces magnétosomes à polariser la cellule. Toutefois, les cellules du morphotype 4 ont un comportement magnétotactique comme la majorité des MTB.

L'appareil flagellaire est quant à lui différent selon les morphotypes de $_{iACC}$MTB-*like*. Les observations au MEB et au MET ont mis en évidence la présence d'un seul flagelle polaire pour les cellules du morphotype 1 (Monteil et al., 2021). Deux faisceaux de flagelles à chaque pôle sont observés pour les cellules du morphotype 2 (**Figure 81**). Les cellules du morphotype 3 ont un seul faisceau de flagelles à un pôle. Les cellules du morphotype 4 ont un flagelle localisé au pôle de la cellule (**Figure 81**).

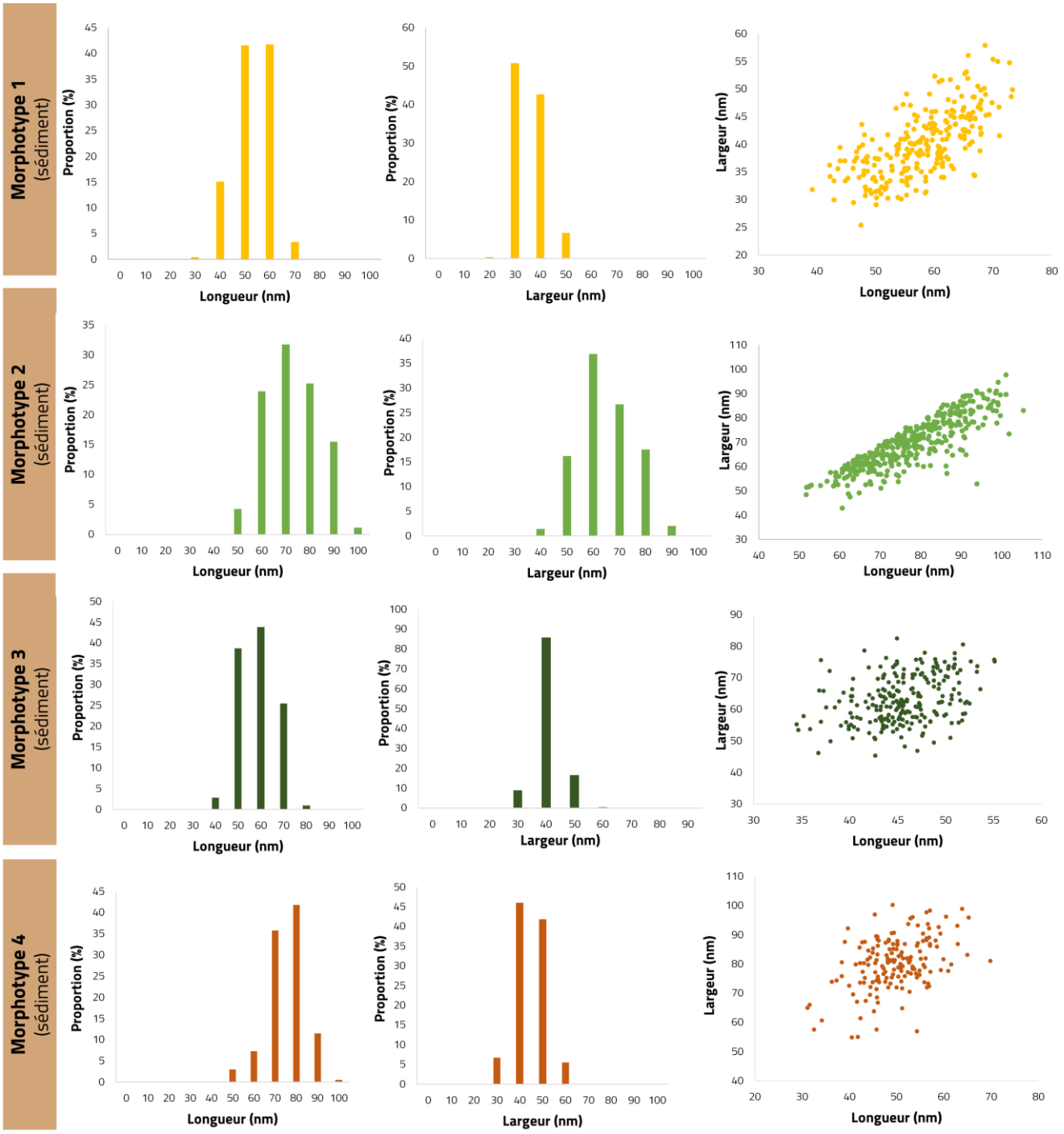


Figure 79 : **Analyse de distribution de taille des magnétosomes et du facteur de forme pour les $_{iACC}$MTB classées par morphotype**. Les histogrammes correspondent à la distribution de la longueur des magnétosomes (nm) (**1ère colonne**), de la largeur des magnétosomes (nm) (**2ème colonne**) et du rapport entre la longueur et la largeur des magnétosomes (facteur de forme) (**3ème colonne**). Ces graphiques témoignent qu'un contrôle strict est réalisé par la cellule sur la taille et la forme des magnétosomes. Nombre de magnétosomes mesurés : morphotype 1 (*n = 242*), morphotype 2 (*n = 352*), morphotype 3 (*n = 212*), et morphotype 4 (*n = 165*).

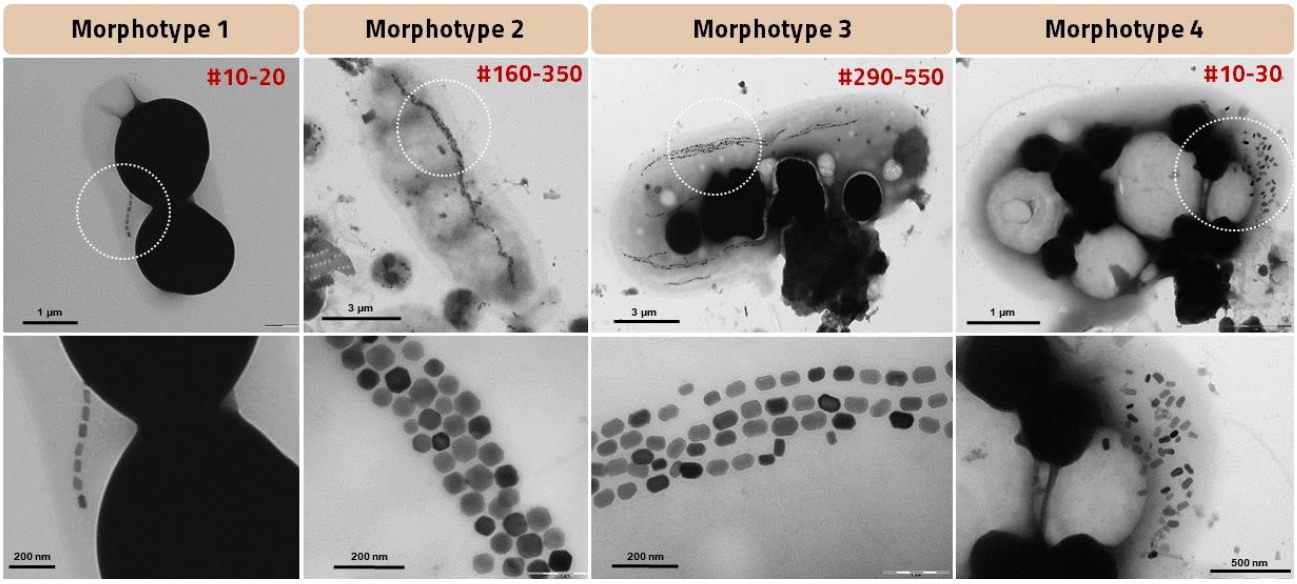


Figure 80 : **Images de MET montrant l'organisation et la morphologie des magnétosomes chez les $_{iACC}$MTB classés par morphotype.** Chaque morphotype est représenté par colonne avec une image de la cellule entière (en haut) à laquelle est associée une image à plus gros grossissement (en bas) au niveau des magnétosomes (représentée par un cercle blanc). Ces images montrent que les magnétosomes sont organisés en une ou plusieurs chaines. Les magnétosomes du morphotype 4 sont désorganisés et systématiquement observés au pôle de la cellule contenant le flagelle. Les magnétosomes ont une morphologie prismatique pour les morphotypes 1, 3 et 4 et cuboctaédrique pour le morphotype 2. Les valeurs en rouge indiquent le nombre de magnétosomes synthétisés par cellule.

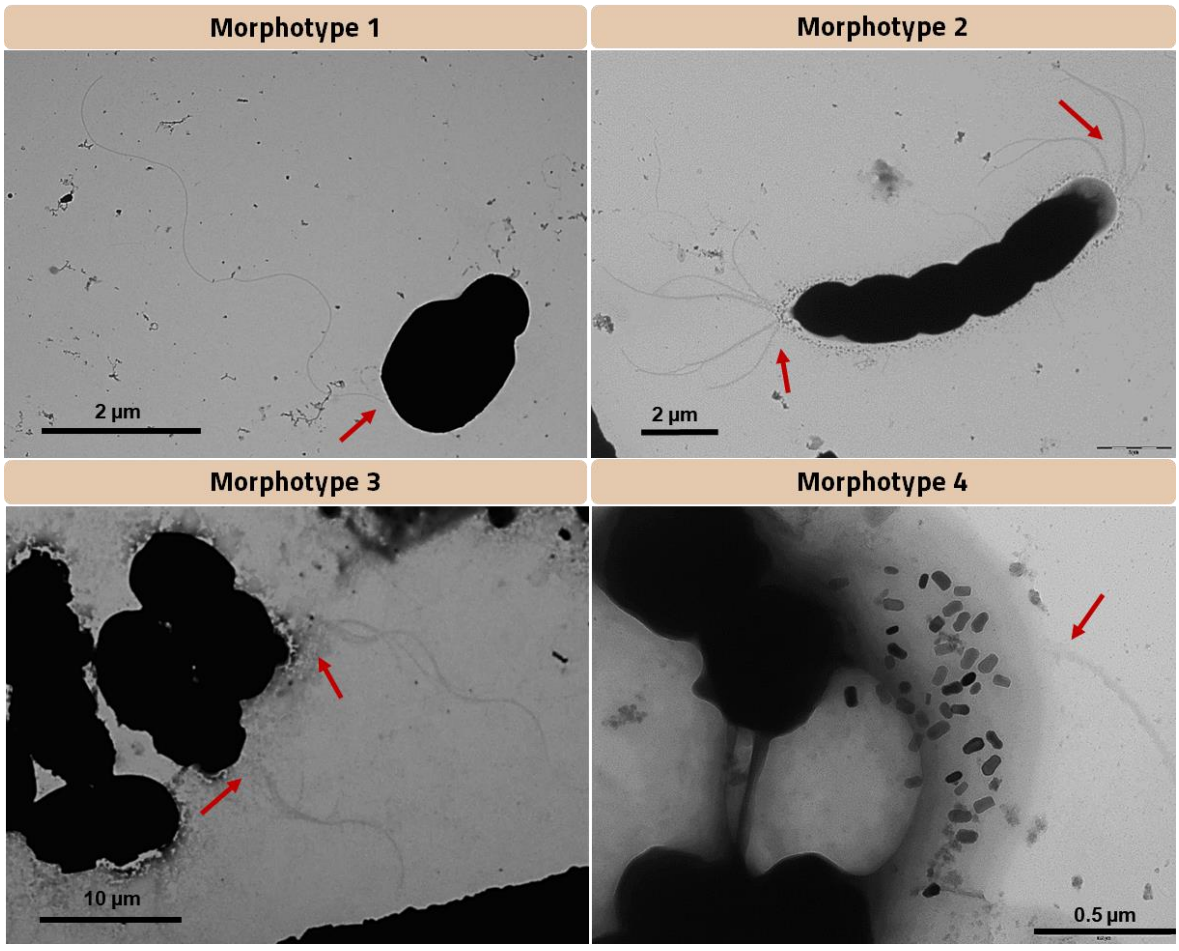


Figure 81 : **Images de MET de cellules représentant les morphotypes 1, 2, 3 et 4 montrant l'emplacement de l'appareil flagellaire**. Les morphotypes 1 et 4 possèdent un seul flagelle localisé au niveau d'un des pôles de la cellule, le morphotype 2 possède deux faisceaux de flagelles aux deux pôles de la cellule tandis que le morphotype 3 possède un seul faisceau de flagelles. Les flèches rouges indiquent la position des flagelles.

3.2.2. Composition chimique des biominéraux

Lorsque les 3 autres morphotypes majoritaires de MTB avec des inclusions réfringentes ont été observés au MO, nous avons supposé qu'ils formaient tous des inclusions d'ACC, comme le **morphotype 1**. Nous avons confirmé cette hypothèse grâce à la MET couplées aux analyses chimiques en mode STEM-HAADF pour la détermination de la composition et répartition élémentaire par spectroscopie XEDS. La cartographie élémentaire en mode STEM-XEDS a indiqué que la phase minérale des grandes inclusions pour chacun des morphotypes contenait principalement du calcium (**Figure 82**). Ces cartographies chimiques confirment également que ces inclusions occupent une grande partie de l'espace cellulaire. De plus, ces analyses permettent de visualiser la localisation cellulaire de la / des chaîne(s) de magnétosomes (représentées en jaune) par l'élément chimique Fe.

Les spectres XEDS associés à chaque cartographie (**Figure 83**) confirment les observations et la présence majoritaire de carbone co-localisé avec l'élément calcium et l'élément oxygène, illustré par des signaux intenses et correspondant à la signature d'un carbonate. Un seul spectre est présenté dans la **figure 83**, car ils sont identiques pour chaque morphotype (**Figure S1, S2, Annexe 1**). Le signal du cuivre correspond à la grille de MET. En comparaison avec le carbone et le calcium, le signal du fer est moins intense. Ceci est dû au fait que la cartographie a été réalisée sur la cellule entière, comme les inclusions de $CaCO_3$ représentent la majeure partie du volume cellulaire, le pic de fer produit par les magnétosomes est faible car ceux-ci occupent une proportion bien plus petite du volume cellulaire.

Les nanocristaux des magnétosomes de toutes les $_{iACC}$MTB sont constitués de Fe et O correspondant vraisemblablement à de la magnétite (Fe_3O_4). Des analyses MET à haute résolution (HR-TEM) couplées à des analyses de transformation de Fourier (FFT) ont permis de confirmer qu'il s'agissait d'une structure cristalline (direction cristallographique [111]) dont la composition chimique (oxyde de Fe III) correspond à la magnétite (**Figure 82**). Ces observations corroborent avec les résultats précédents indiquant des différences morphologiques (e.g. octaèdre, prisme) et d'organisation des magnétosomes pour chacun des morphotypes.

L'ensemble de ces résultats confirme que les cellules des morphotypes 2, 3, et 4 **biominéralisent des nanocristaux de magnétite et des phases minérales intracellulaires enrichies en Ca, C et O comme éléments majeurs** (**Figures 82 et 83**). Ces données valident l'hypothèse sur la minéralogie des inclusions (i.e. des inclusions intracellulaires composées de $CaCO_3$, comme le morphotype 1. Nous pouvons également noter la présence d'autres éléments à l'état de traces dans les inclusions, notamment le strontium et le baryum, indiquant que d'autres AEM pourraient également être impliquées dans la formation des phases carbonatées des $_{iACC}$MTB. Cela avait été montré pour le morphotype 1 (Monteil et al., 2021) mais également pour les cultures de certaines cyanobactéries (Cam et al., 2016).

Des expériences de synchrotron en utilisant de la microscopie aux rayons X à balayage en transmission (STXM) à haute résolution avaient permis de confirmer que ces inclusions riches en Ca sont bien des carbonates (Monteil et al., 2021). Des analyses de synchrotron similaires ont été réalisées sur les trois autres morphotypes mais n'ont pas permis de donner de résultats car 1) les morphotypes 2 et 3 ont des inclusions de trop grande taille conduisant à une saturation du signal du carbone et 2) le morphotype 4 est trop peu abondant pour permettre la préparation d'échantillons pour ce genre d'approche. D'autres approches seront réalisées pour prouver que les inclusions de toutes les $_{iACC}$MTB sont amorphes notamment par spectroscopie Raman, une technique récemment utilisée par notre consortium de recherche pour prouver la nature amorphe des ACC des cellules d'*Achromatium* du lac Pavin (Benzerara et al., 2021).

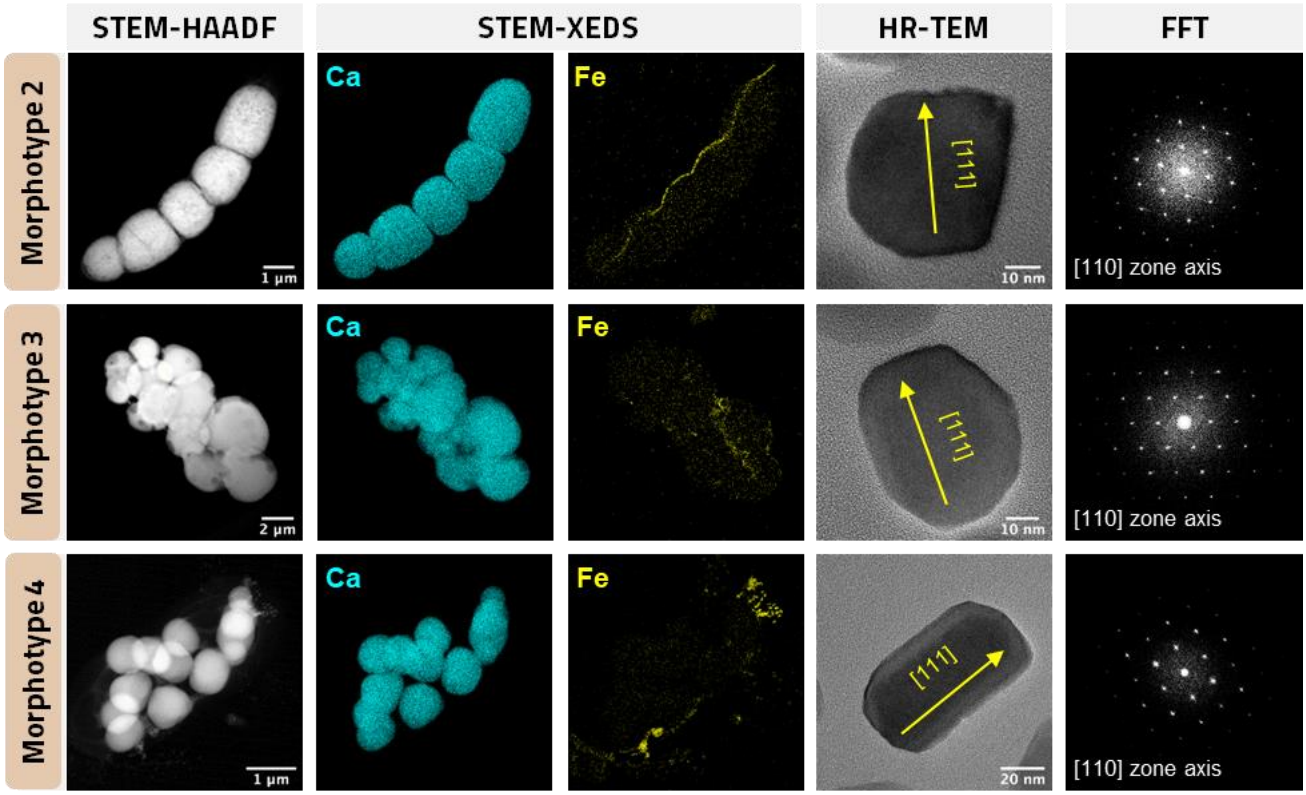


Figure 82 : **Cartographies élémentaires de 3 des 4 morphotypes de $_{iACC}$MTB dominants dans les sédiments à partir d'images STEM-HAADF et analyses de diffraction (HR-TEM) des magnétosomes correspondant**. Cartographie élémentaire XEDS du Calcium (Ca-K), et Fer (Fe-K) pour les cellules appartenant au morphotype 2 (1ère ligne), au morphotype 3 (2ème ligne) et au morphotype 4 (3ème ligne). Les deux dernières colonnes représentent les analyses de HR-TEM et d'une analyse de transformée de Fourier (FFT) des magnétosomes confirmant la signature cristalline de la magnétite. Tous mes morphotypes de $_{iACC}$MTB forment donc des inclusions majoritairement composées de calcium (Ca) et des nanocristaux de magnétite (Fe_3O_4).

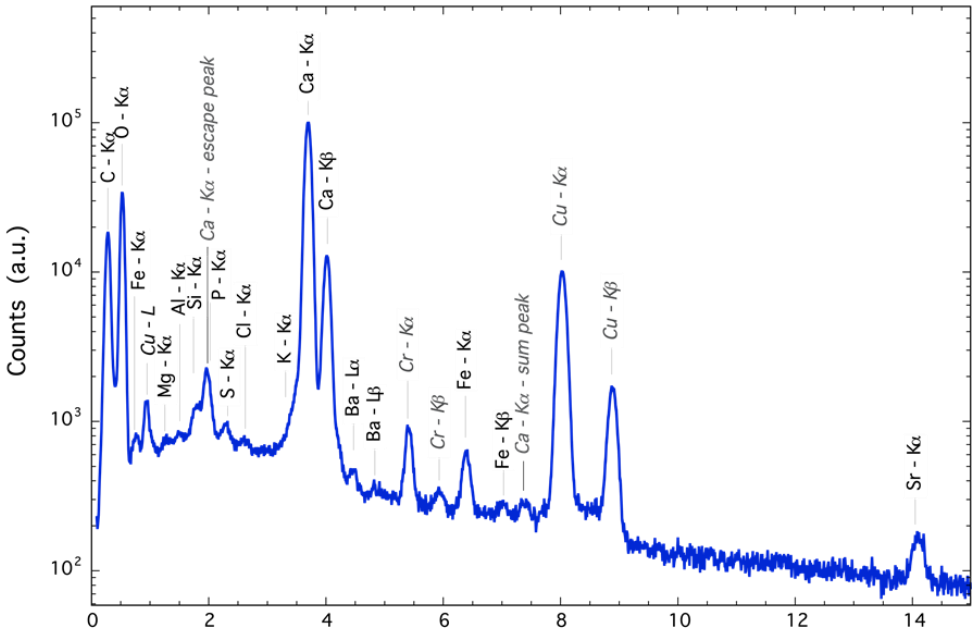


Figure 83 : **Spectre XEDS d'une iACC du morphotype 2** représentatif des spectres de tous les morphotypes (cf. Annexe 1). Le spectre XEDS montrent que cette inclusion est majoritairement composée de l'élément carbone, oxygène et de calcium évoquant la signature des carbonates de calcium ($CaCO_3$).

4. Caractérisation des $_{iACC}$MTB de la colonne d'eau

Les dernières campagnes de prélèvement au lac Pavin (**Mx66** à **Mx71**) auxquelles j'ai participé ont confirmé les observations de Monteil et al (2021) et de Bidaud *et al* (2022) ; contrairement aux sédiments, les populations de $_{iACC}$MTB sont représentées par un seul morphotype semblable au morphotype 1 : un bâtonnet biominéralisant 2 à 4 inclusions très denses aux électrons du MET et très réfringentes sous le MO, ayant la même nage, la même morphologie et le même comportement magnétique (Bidaud et al., 2022). L'OATZ de la colonne d'eau du lac Pavin abrite donc une diversité nettement moins importante de $_{iACC}$MTB que dans les sédiments.

Si d'un point de vue morphologique, ces populations semblent identiques, plusieurs traits les différencient de celles des sédiments. En effet, la majorité des cellules forment des magnétosomes avec une forme octaédrique (**Figure 84**), contrairement aux cellules du morphotype 1 des sédiments dont les magnétosomes ont une forme majoritairement prismatique (**Figure 80**). L'identification taxonomique présentée dans les sections suivantes et l'appartenance de cette bactérie à une niche écologique très différentes ont appuyé notre choix de la classer séparément. Ainsi, **les $_{iACC}$MTB de la colonne d'eau sont classés sous un morphotype différent : le morphotype 5**.

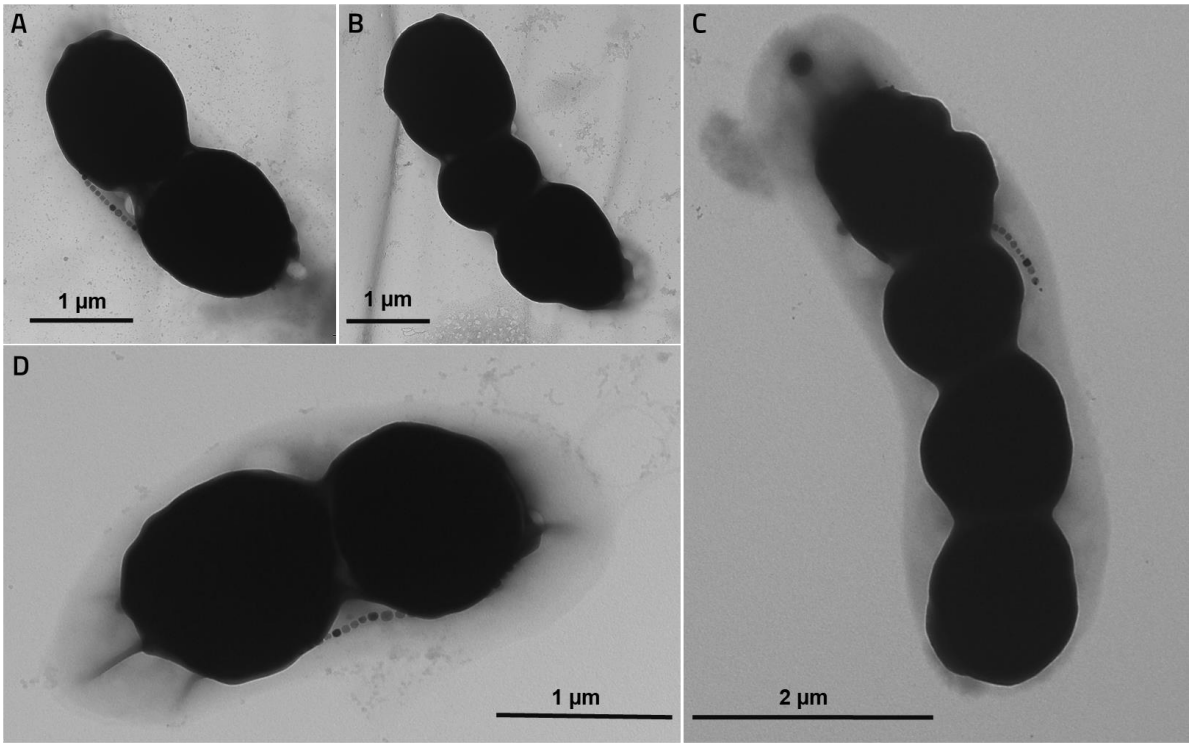


Figure 84 : **Images de microscopie électronique en transmission de $_{iACC}$MTB représentées par un seul morphotype (i.e. morphotype 5) au niveau de l'OATZ dans la colonne d'eau du lac Pavin**. A) et D) Morphotype 5 formant deux, B) trois et C) quatre iACC. Les inclusions apparaissent en noir en raison de leur densité aux électrons sous le MET. Les magnétosomes cuboctaédriques sont organisés en une seule chaîne.

Le morphotype 5 ayant fait l'objet d'une description partielle dans l'article de Monteil et *al.*, (2021) et Bidaud et *al.* (2022), j'ai complété la description de ce morphotype avec des analyses de microscopie, de biologie moléculaire, et de génomique durant ma thèse. Ces données ont été comparées avec celles des morphotypes des sédiments (1, 2, 3, 4). Les grilles de MET préparées durant les différentes missions de terrain ont permis d'obtenir des informations sur les magnétosomes du morphotype 5. Les mesures confirment la nature octaédrique des cristaux avec une longueur de taille similaire à celle de largeur (**Figure 85**). Le graphique illustré dans la 3ème colonne de la **figure 85** correspond au facteur de forme « *shape factor* », c'est-à-dire à la relation entre la longueur et la largeur des magnétosomes, le rapport longueur sur largeur étant proche de 1. **Ces graphiques montrent que la distribution de taille des magnétosomes du morphotype 5 est similaire à celle retrouvée chez le morphotype 2** (**Figure 79**, 1ère colonne).

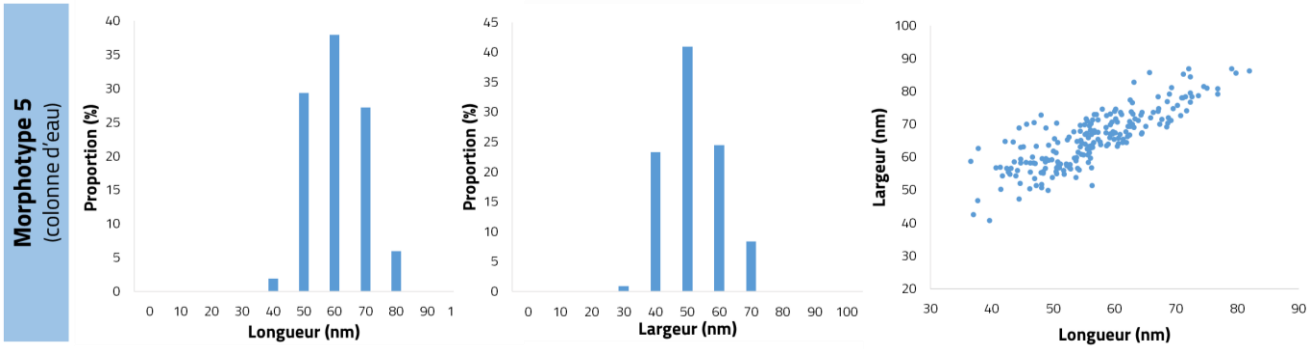


Figure 85 : **Analyse de distribution de taille des magnétosomes et du facteur de forme pour le morphotype de iACCMTB de la colonne d'eau (morphotype 5).** Les histogrammes correspondent à la distribution de la longueur des magnétosomes (nm), de la largeur des magnétosomes (nm) et du rapport entre la largeur et la longueur des magnétosomes (facteur de forme). Ces graphiques témoignent d'un contrôle strict de la cellule sur la taille et la forme des magnétosomes. Nombre de magnétosomes comptés : *n = 200*.

5. Identification et classification taxonomique des iACCMTB de chaque morphotype

5.1. Séquençage de l'ADNr 16S et recherche de similarités avec des espèces connues

Une fois les différentes iACCMTB classées en morphotypes, leur identité a été déterminée à partir de la séquence des gènes codant l'ARNr 16S. Plusieurs cellules du même morphotype ont été micromanipulées et leur ADN a été amplifié. Ainsi, pour chaque cellule, il a été possible d'obtenir une séquence du gène codant pour l'ARNr 16S et de l'associer à une ultrastructure. Plusieurs séquences ont été obtenues pour chaque morphotype afin 1) d'étudier la diversité spécifique / variabilité au sein d'un même morphotype et 2) réaliser des sondes oligonucléotidiques spécifiques de chaque morphotype pour associer une identité à un morphotype grâce à la méthode de FISH et le microscope confocal. Cette validation ayant déjà été faite pour le morphotype 1, nous nous sommes concentrés sur les morphotypes 2, 3 et 4. Pour chaque morphotype nous avons obtenu entre 5 et 10 séquences d'une longueur comprise entre 1400 et 1500 bp. Une ou plusieurs OTUs ont été définies par morphotype. Une OTU ici a été définie sur la base d'un seuil d'identité de 99%, c'est à dire que deux cellules appartiennent à la même OTU si leurs séquences sont ≥ 99%.

Les séquences des OTUs ont été comparées à celles de la base de données publique NCBI « *Nucleotide Collection (Nr/Nt)* » en sélectionnant d'abord uniquement les séquences de souches type, et une seconde fois en incluant celles de toutes les séquences environnementales et/ou non cultivées. Cette comparaison a été effectuée avec l'outil BLASTN et les paramètres par défaut qui permet d'aligner des séquences deux à deux pour en trouver les régions similaires et identiques. Il est possible de regarder la distribution de ces séquences par rang taxonomique, ce qui donne une idée de la

taxonomie des séquences des iACCMTB dont nous voulons connaître l'identité avant d'effectuer des arbres phylogénétiques.

Nous avons considéré que des séquences pouvaient appartenir à la même espèce ou genre, lorsque les identités étaient comprises entre ~ 97-100% et ~ 94-97%, respectivement. A l'exception d'un groupe d'OTUs, nous ne sommes jamais tombés dans ce cas de figure. Tous les pourcentages d'identité obtenus avec les alignements des séquences étaient en dessous de ces seuils, seuils à partir desquels les assignements sont moins évidents. Entre 88 et 92% d'identité, il est possible de trouver des séquences appartenant à des familles / ordres voire parfois des classes différentes. La pertinence biologique de ces seuils peut différer suivant le groupe.

Le **tableau 3** résume l'ensemble des résultats de BLAST obtenus pour l'ensemble des morphotypes en montrant uniquement quelques séquences d'ADNr 16S représentatives des collections *refseq_rna* avec lesquelles le score d'alignement et le pourcentage d'identité étaient les plus importants. Pour les populations de **morphotype 1**, 18 séquences avaient été obtenues (entre 1450 et 1492 pb) formant 5 OTUs partageant 92,8 à 98,3% d'identité entre elles. Ces résultats indiquent que ce morphotype est composé de plusieurs espèces (i.e. avec des pourcentages de similarités < 99%), appartenant probablement à au moins deux genres sur la base d'un seuil d'identité de séquence de 95 % (Monteil et al., 2021). Les résultats de BLASTN indiquent que les espèces cultivées les plus proches appartiennent aux genres *Azospirillum* et *Skermanella* de la famille des *Azospirillaceae* dans la classe des *Alphaproteobacteria* (**Tableau 3**). Cependant, les identités de séquence avec ces genres étaient faibles (entre 91,7 et 93,8 %) suggérant que toutes les bactéries au sein du morphotype 1 appartiennent à au moins deux groupes de genre non décrits (Monteil et al., 2021).

Tableau 3 : **Séquences d'ADNr 16S des souches de référence et environnementales dont les alignements obtenus suite à un BLAST avec les séquences des OTUs de iACCMTB ont donné les meilleurs scores d'homologie et pourcentages d'identité.** Chaque séquence est associée à sa taxonomie actuelle dans NCBI (bien qu'elle puisse différer dans celle de GTDB) et son numéro d'accession. Les séquences sont organisées par morphotype : 1, 2, 3, 4 (sédiments) et 5 (colonne d'eau)

Morphotype de iACCMTB	Nombre de séquences	Nombre d'OTU	Séquence la plus proche (souche de référence)	Numéro d'accession GenBank	Identité (%)	Séquence la plus proche (environnementale)	Numéro d'accession GenBank	Identité (%)	Affiliation taxonomique
1	18	**5**	*Skermanella rosea* strain M1	NR_152076.1	93.82	Uncultured *Azospirillum* sp. clone WYHS-1	MW646017.1	94.14	*Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Azospirillaceae*
			Skermanella rosea strain M1	NR_152076.1	93.20	Uncultured *Azospirillum sp.* clone E296	HG917273.1	93.36	
			Skermanella aerolata strain 5416T-32	NR_043929.1	92.66	Uncultured *Azospirillum sp.* clone E296	HG917273.1	92.31	
			Skermanella rosea strain M1	NR_152076.1	92.22	Uncultured *Azospirillum sp.* clone E296	HG917273.1	92.46	
			Skermanella aerolata strain 5416T-32	NR_043929.1	91.02	Uncultured bacterium clone C117	KJ817664.1	91.30	
2	9	**2**	*Azospirillum picis* strain IMMIB TAR-3	NR_042682.1	93.16	Uncultured bacterium clone Foos8B_82	EU431822.1	93.32	*Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Azospirillaceae*
			Nitrospirillum amazonense strain DSM 2787	NR_117477.1	94.33	Uncultured bacterium clone Foos8B_82	EU431822.1	93.06	
3	9	**4**	*Ectothiorhodospira mobilis* strain DSM 237	NR_125567.1	92.08	Uncultured bacterium clone Nit5A0622_503	FJ628257.1	97.32	*Gammaproteobacteria; Chromatiales* ou *Methylococcales; Ectothiorhodospiraceae* ou *Methylococcaceae*
			Thioalkalivibrio sulfidiphilus strain HL-EbGR7	NR_074692.1	90.45	Gamma proteobacterium GRS-1	AB897514.1	99.04	
			Thioalkalivibrio sulfidiphilus strain HL-EbGR7	NR_074692.1	89.44	Uncultured bacterium clone Nit5A0622_503	FJ628257.1	95.84	
			Methylococcus capsulatus strain Texas	NR_029241.1	90.56	Gamma proteobacterium GRS-1	AB897514.1	99.91	
4	7	**3**	*Halochromatium glycolicum* strain BN 3201	NR_044896.1	92.18	Uncultured bacterium clone HWB2224-3-10	HM243841.1	92.72	*Gammaproteobacteria; Chromatiales; Chromatiaceae*
			Phaeobacterium nitratireducens strain AK40	NR_136764.1	91.45	Uncultured bacterium clone YT34 16S	KJ461504.1	92.39	
			Thiospirillum jenense strain DSM 216	NR_173628.1	90.78	Uncultured bacterium clone YT34 16S	KJ461504.1	92.21	
5	5	**1**	*Azospirillum ramasamyi* strain M2T2B2	NR_170391.1	91.19	Uncultured bacterium clone SY201307-2	KX508689.1	91.64	*Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Azospirillaceae*

Les bactéries assignées au **morphotype 2** forment deux OTUs et sont également affiliées à la famille des *Azospirillaceae* (anciennement *Rhodospirillaceae*) de la classe des *Alphaproteobacteria* (**Tableau 3**). Les identités de séquence les plus élevées ont été obtenues avec les genres *Azospirillum* et *Nitrospirillum* (entre 92 et 96 %), et celles avec les OTUs du morphotype 1 sont de ~92-94% ce qui laisse à penser que les morphotypes 1 et 2 appartiennent à des genres bien distincts. Pour les deux premiers morphotypes, les séquences d'ARNr 16S les plus proches en réalisant un BLAST sur toute la base de données NCBI sont des souches cultivées.

Pour les bactéries de **morphotype 3** formant quatre OTUs, si on peut affirmer qu'elles appartiennent à la classe des *Gammaproteobacteria,* leur assignation à une famille voire même un ordre n'est pas possible sur la seule base des alignements de l'ADNr 16S avec les séquences des collections. Les espèces cultivées les plus proches appartenaient aux

genres *Ectothiorhodospira, Thioalkalivibrio*, et *Methylococcus* pour ce morphotype (**Tableau 3**). Ainsi, les meilleurs alignements ont été obtenus avec des séquences de deux familles/ordres très éloignées dont celles des *Ectothiorhodospiraceae* (ordre des *Chromatiales* selon la taxonomie NCBI*)* et *Methylococcaceae* (ordre des *Methylococcales*).

D'autre part les identités de séquence sont très faibles (89 à 92%), ce qui pourrait aussi suggérer que les iACCMTB du morphotype 3 représentent un nouvel ordre au sein des *Gammaproteobacteria* proche de ceux des *Chromatiales* et *Methylococcales.* Il est particulièrement nécessaire ici de réaliser un arbre phylogénétique pour positionner exactement les iACCMTB au sein des *Gammaproteobacteria*. Ce dont nous sommes sûrs à ce stade, c'est qu'avec seulement 87% d'identité de séquence avec l'ADNr 16S de *Candidatus* Achromatium palustre Sipp_2015, ces iACCMTB seraient génétiquement très éloignés de la sulfoxydante géante déjà connue pour former des iACC intracellulaires (Benzerara et al., 2021).

A noter, que tout comme les morphotypes 1 et 2, les iACCMTB du morphotype 3 représentent non seulement plusieurs espèces, mais surement plusieurs genres et familles puisque les séquences des OTUs sont identiques entre 92 et 96%. Cependant, contrairement aux morphotypes 1 et 2, nous avons identifié une séquence environnementale identique à près de 99% avec un des OTUs (**Tableau 3**). Cette séquence environnementale appartient à une bactérie magnétotactique GRS-1 (AB897514.1) isolée au Japon formant des inclusions riches en calcium, mais dont la présence de carbonates n'avait jamais été prouvée (Taoka et al., 2014).

Les iACCMTB du **morphotype 4** appartiennent également à la classe des *Gammaproteobacteria*. L'ensemble des séquences alignées avec les trois OTUs très proches l'une de l'autre (séquences identiques à 98-98,5 %) semblent majoritairement appartenir à la famille des *Chromatiaceae* de l'ordre des *Chromatiales*. Les espèces cultivées les plus proches appartiennent aux genres *Phaeobacterium*, *Halochromatium* et *Thiospirillum* (**Tableau 3**). Comme pour les autres morphotypes, les identités de séquence des trois OTUs avec ces genres cultivés sont faibles (90 à 92 %) ce qui suggère que le morphotype 4 est représenté par deux espèces d'un genre non décrit, très éloigné également de *Candidatus* Achromatium palustre Sipp_2015 avec qui elles ne partagent que 88% d'identité de séquence avec l'ADNr 16S.

L'identité des iACCMTB du **morphotype 5** isolées dans la **colonne d'eau** du lac Pavin a également été déterminée en séquençant le gène codant pour l'ARNr 16S. En effet, même si la découverte de ces populations avait déjà été rapportée par Monteil et al., (2021) les auteurs n'avaient pas réussi à obtenir de séquence d'ADNr 16S pour ce morphotype. Durant ma thèse, j'ai réussi à obtenir plusieurs séquences formant une seule OTU. Les résultats de BLASTN indiquent que les espèces cultivées les plus proches des iACCMTB du **morphotype 5** appartiennent au genre *Azospirillum* de la famille des *Azospirillaceae* dans

la classe des *Alphaproteobacteria* (**Tableau 3**). Cependant, les identités de séquence avec ce genre sont faibles (entre 91 et 91,8 %) suggérant que toutes les bactéries au sein du morphotype 5 appartiennent à une espèce d'un nouveau genre non décrit. Les identités étaient encore plus faibles avec certaines OTUs du morphotype 1 et de manière surprenante, plus fortes de ~2% avec les OTUs du morphotype 2 qui pourtant, se distingue plus d'un point de vue morphologique.

Nous avons donc observé une cohérence entre notre classification en morphotypes et les résultats de séquençage. C'est-à-dire que nous avons obtenus des séquences proches, voire identiques, pour des iACCMTB de même morphotype triés au microscope optique.

5.2. Validation des identités par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

La micromanipulation de cellules uniques est compliquée à mettre en œuvre car elle doit être réalisée en conditions stériles et l'ensemble des manipulations jusqu'à l'amplification de génome peut très facilement amener des contaminations. Ainsi, parmi la cinquantaine de cellules uniques de iACCMTB que j'ai micromanipulées, autour de 1/3 n'a pas pu être exploité à cause de contamination ou d'absence d'ADN. Le fait que les cellules aient été extraites d'environnements complexes et diversifiés n'exclut pas la possibilité de la micromanipulation d'une autre cellule à proximité qui aurait pour conséquence une mauvaise assignation taxonomique. Des étapes de vérification des résultats de séquençage sont donc nécessaires pour confirmer la spécificité d'une séquence afin de valider l'affiliation des cellules à un groupe génétique pour chaque morphotype. Pour cela, j'ai utilisé une technique de cytogénétique : l'Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) qui lie des sondes oligonucléotidiques spécifiques des séquences d'ADNr 16S à l'ADN complémentaire des bactéries d'intérêt. La microscopie à fluorescence est ensuite utilisée pour visualiser l'association d'une séquence d'ADNr 16S à une morphologie cellulaire.

Les sondes oligonucléotidiques ont été développées pour chaque morphotype avec l'alignement des séquences obtenues du **tableau 3** et sont données dans le **tableau 4**. Les séquences d'ADNr 16S ont été alignées, une région conservée d'une vingtaine de nucléotides a été choisie pour chaque morphotype et a été alignée avec les séquences de la base *Nucleotide Collection (Nr/Nt)* pour vérifier sa spécificité. J'ai donc pu valider les identités des morphotypes d'ACCMTB 2, 3 et 4, l'identité du **morphotype 1** ayant déjà été validée par Monteil et al., (2021). Pour chaque préparation, (i) la coloration au DAPI nous a permis de visualiser l'ADN de tous les organismes présents, (ii) la sonde EUB338, spécifique des bactéries, a permis de visualiser l'ADN des bactéries et (iii) les sondes CCP2p, 3p et 4p ont permis de visualiser spécifiquement les morphotypes 2, 3 et 4. Ainsi, l'association des séquences à des tailles, morphologies et ultrastructures a bien été validée pour toutes les iACCMTB (**Figure 86**).

Tableau 4 : **Sondes oligonucléotidiques développées pour le morphotype 2 (CCP2p), morphotype 3 (CCP3p) et morphotype 4 (CCP4p) des sédiments pour les expériences de FISH.** Chaque sonde oligonucléotidique est associée à une séquence nucléotidique (sens 5' vers 3') (2ème colonne) dont la position des nucléotides est indiquée (3ème colonne). Le nombre de séquences utilisées pour la fabrication de la sonde est indiqué dans la 4ème colonne. La sonde EUB338 est spécifique aux *Eubacteria*.

Nom de la sonde	Séquence 5'> 3'	Position (nucléotides)	Nombre de séquences utilisées (réalisation de la sonde)
EUB338	5'-ATTO633-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	338-355	Amaan *et al*., 1990
CCP2p	5'-ATTO488-CCATCCCATGGCGATAAATC-3'	175-194	9
CCP3p	5'-ATTO488-GAAGGCACTCTCATGTCTCCATAAG-3'	992-1016	9
CCP4p	5'-ATTO488-CTAGCTAATCGGAC GTGGGCTCATCTGATAG-3'	201-237	7

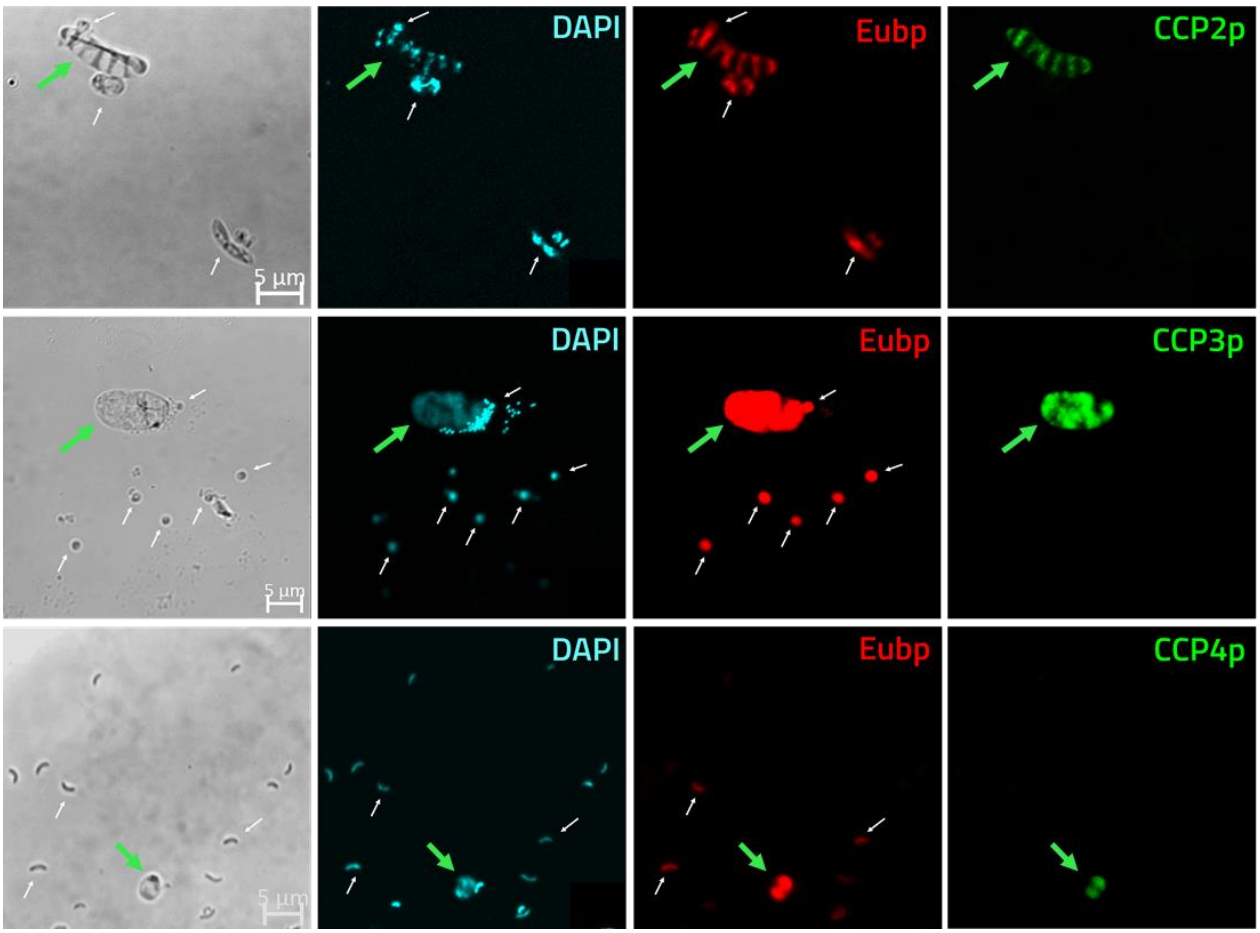


Figure 86 : **Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) réalisée pour les 3 nouveaux morphotypes de iACCMTB**. Pour chaque morphotype, il a été possible d'obtenir des images au microscope confocal en lumière transmise (1ère colonne), à balayage laser des cellules marquées avec le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (2e colonne), hybridées avec la sonde spécifique aux bactéries (Eubp) (3e colonne), et enfin hybridées avec la sonde spécifique du morphotype d'intérêt (4e colonne). Les flèches blanches montrent les MTB qui servent de témoin, tandis que les flèches vertes montrent les iACCMTB.

Il n'a pas été nécessaire de réaliser des étapes de vérification de FISH pour le **morphotype 5** car la **colonne d'eau**, contrairement au sédiment, est un environnement moins diversifié qui abrite un seul morphotype de iACCMTB. Les risques de micromanipulation d'une autre cellule environnementale à proximité, qui auraient pour conséquence une mauvaise assignation taxonomique, sont donc très faibles.

5.3. Séquençage des génomes des 5 morphotypes de iACCMTB

Cette première section décrit la liste des génomes obtenus durant cette thèse. Plusieurs essais de séquençage de génome en utilisant les technologies Illumina et Nanopore ont été faits à partir de l'ADN amplifié des cellules que j'ai micromanipulées. Des assemblages des séquences de SAGs ont été réalisés et le taux de complétude de chacun d'eux a été calculé avec le programme CheckM. Beaucoup des SAGs obtenus (une vingtaine) ont été de mauvaise qualité et n'ont pas été utilisés dans cette étude, mais nous sommes arrivés à obtenir au moins un SAG de bonne qualité (>90% de complétude pour la plupart) pour chaque morphotype à l'exception des morphotypes 1 et 5. Concernant le **morphotype 1**, nous avons rencontré plusieurs difficultés pour obtenir un génome assemblé et de bonne complétude tout comme dans Monteil et al., (2021). En effet, Monteil *et al.* (2021) avaient obtenu un génome partiel de ce morphotype (i.e. une séquence partielle du génome de 2,5 Mb) et de faible complétude (i.e. complétude estimée à moins de 22 %).

Au cours de ma thèse, nous avons donc tenté une approche alternative, autre que la micromanipulation d'une cellule unique, via des approches de métagénomique pour assembler un génome de iACCMTB de **morphotype 1** et **5**. Nous avons cependant rencontré des difficultés lors des étapes d'extraction de l'ADNg (e.g. méthode standard d'extraction au phénol-chloroforme et kits commerciaux), ne nous permettant pas d'obtenir une quantité suffisante pour le séquençage du génome entier pour le **morphotype 1**. Nous avons gardé l'assemblage de Monteil *et al.* (2021), qui est resté celui de meilleure qualité. Par contre, nous avons réussi à assembler un génome à partir d'un métagénome (MAG pour *Metagenome Assembled Genome*) de iACCMTB de **morphotype 5** de la colonne d'eau. L'ensemble des 8 génomes produits/utilisés dans cette étude, est listé dans le **Tableau 5**. La taille des génomes est comprise entre 3,31 et 4,38 Mbp, avec un taux de complétude suffisamment satisfaisant (i.e. entre 58.53 et 92.98 %) pour obtenir assez de marqueurs conservés pour une reconstruction fiable de la phylogénie (section 5.4) ou pour reconstituer des voies métaboliques complètes des populations de MTB formant des iACC (section 6.2).

Tableau 5 : **Liste des génomes de iACCMTB obtenus pour représenter les 5 morphotypes**. Chaque cellule micromanipulée correspond à un numéro de morphotype de iACCMTB. Plusieurs génomes ont été assemblés pour le morphotype 3. Plusieurs caractéristiques respectives sont listées dont : le nombre de séquences codantes (CDS), la taille du génome (en bases), le taux de complétude (en %) et le taux de contamination (en %) calculés avec CheckM, le taux de GC (en %) et le nombre de contigs.

Morphotype de iACCMTB	Nom du génome assemblé (SAG)	Numéro d'accession (GenBank)	Nombre de CDS	Taille du génome (bases)	Taux de complétude (%)	Taux de contamination (%)	Taux de G + C (%)	Nombre de Contig
Morphotype 1 (sédiment)	Uncultured bacterium clone CCP1 **Monteil *et al.*, 2021**	GCA_963575705.1		2 500 000	< 22 %			
Morphotype 2 (sédiment)	*Azospirillaceae* bacterium **CCP2-SC5**	GCA_963575675.1	3 994	4 378 614	90.39 %	3.49 %	52.83	283
Morphotype 3 (sédiment)	*Gammaproteobacteria* bacterium **CCP3-SC1**	GCA_963575655.1	3 822	4 243 578	92.98 %	0.99%	51.97	261
	Gammaproteobacteria bacterium **CCP3-SC15AN1**	GCA_963575685.1	4 767	4 388 902	69.54 %	1.90 %	54.11	710
	Gammaproteobacteria bacterium **CCP3-SC1AL1**	GCA_963575665.1	3 774	3 310 912	82.99 %	1.67 %	43.25	478
	Gammaproteobacteria bacterium **CCP3-SC5AM1**	GCA_963575715.1	3 120	3 733 433	91.12 %	1.23 %	47.52	363
Morphotype 4 (sédiment)	*Gammaproteobacteria* bacterium **CCP4-SC76**	GCA_963575725.1	4 774	4 097 543	58.53 %	2.01 %	56.27	825
Morphotype d'iACCMTB	**Nom du métagénome assemblé (MAG)**		**Nombre de CDS**	**Taille des génome (bases)**	**Taux de complétude (%)**	**Taux de contamination (%)**	**Taux de G + C (%)**	**Nombre de Contig**
Morphotype 5 (colonne d'eau)	*Azospirillaceae* bacterium **CCP5-WCLP8**	GCA_963575695.1	3 974	3 731 074	89.81 %	2.09 %	60.33	561

5.4. Distribution phylogénétique des iACCMTB au sein des *Pseudomonadota*

La similarité de séquence seule ne suffit pas pour rendre compte des relations de parenté entre organismes. Seule des méthodes de phylogénie moléculaire peuvent permettre d'inférer les relations de parenté entre iACCMTB et la diversité des bactéries connues. Inférer des phylogénies à partir des séquences d'ADNr 16S est utile car les banques de données contiennent un grand nombre de séquences. D'un autre côté, le signal contenu dans le seul gène codant pour l'ARNr 16S n'est pas suffisant pour reconstruire des phylogénies robustes. Aujourd'hui la métagénomique remplace le metabarcoding, mais beaucoup de génomes assemblés de métagénomes n'ont pas de séquences d'ADNr 16S.

Nous avons donc construit des arbres phylogénétiques à partir d'une part (i) des séquences d'ADNr 16S de l'ensemble des cellules de iACCMTB micromanipulées, de celles des souches types, et des séquences environnementales d'intérêt uniquement, et d'autre part (ii), de marqueurs conservés chez les bactéries, extraits de génomes représentants les différents morphotypes. Cette section présente les travaux de phylogénie moléculaire réalisés pour les iACCMTB des **morphotypes 1, 2 et 5 appartenant aux *Alphaproteobacteria*** d'une part, et ceux réalisés pour les iACCMTB des **morphotypes 3 et 4 appartenant aux *Gammaproteobacteria*** d'autre part. J'ai réalisé une partie des arbres basés sur le gène codant pour l'ARNr 16S, tandis que Marine Bergot, ingénieure d'étude au laboratoire et ma co-encadrante Caroline Monteil ont réalisé les arbres basés sur les génomes.

5.4.1. Diversité des iACCMTB au sein des *Azospirillaceae*

Les arbres phylogénétiques construits pour décrire l'histoire évolutive des iACCMTB des morphotypes 1, 2 et 5 ont été les plus « faciles » à construire car ils appartiennent tous à une même famille au sein des *Alphaproteobacteria* : la famille des *Azospirillaceae*. Un arbre phylogénétique doit être raciné ; c'est le racinement qui permet de donner un sens de lecture à l'arbre et de définir l'ancestralité des groupes les uns par rapport aux autres. Dernièrement, en étudiant l'émergence du style de vie parasitaire des *Rickettsiales* et *Holosporales*, Muñoz-Gómez et al., (2019) ont proposé une nouvelle phylogénie des *Alphaproteobacteria* permettant d'identifier un groupe externe aux *Azospirillaceae ;* les *Holosporales.* Cependant, représentant un groupe de symbiontes exclusivement, la composition nucléotidique de leur ADN pourrait poser des problèmes à la reconstruction des arbres. Nous avons donc choisi un groupe externe monophylétique plus ancestral composé de bactéries environnementales : la famille des *Rhodospirillaceae.*

Bien qu'ils soient phénotypiquement et génotypiquement très différents, les séquences associées aux morphotypes **1** et **2** (provenant de cellules isolées des sédiments) et au morphotype **5** (provenant de cellules isolées de la colonne d'eau) appartiennent toutes à la famille des ***Azospirillaceae*** dans la classe des *Alphaproteobacteria.* Nous avons fait un premier arbre basé sur le gène codant pour l'ARNr 16S (**Figure 87**) pour décrire les relations de parenté entre tous ses membres. Les iACCMTB de chaque morphotype forment des groupes monophylétiques soutenus (valeur de bootstrap >80%). Le groupe des MTB du morphotype **1** (sédiment) semble être un groupe ancestral à toutes les *Azospirillaceae.* Cependant, les nœuds internes profonds étant statistiquement mal soutenus, nous ne pouvons pas faire confiance à la topologie globale de l'arbre. Aucune des souches types dans cet arbre (e.g. des genres *Azospirillum, Nitrospirillum, Skermanella, Deserticella, Desertibacter*, et *Arenibaculum*), ne sont connues à ce jour pour former des magnétosomes, ou des carbonates intracellulaires. Toutefois, les iACCMTB du morphotype **2** (sédiment) semblent proches du genre *Azospirillum* et d'une bactérie environnementale magnétotactique **WYHS-1**, qui pour rappel, est connue pour être une MTB formant des inclusions de PolyP enrichies en Ca/Mg et des granules de soufre élémentaire (S^0) (Li et al., 2021).

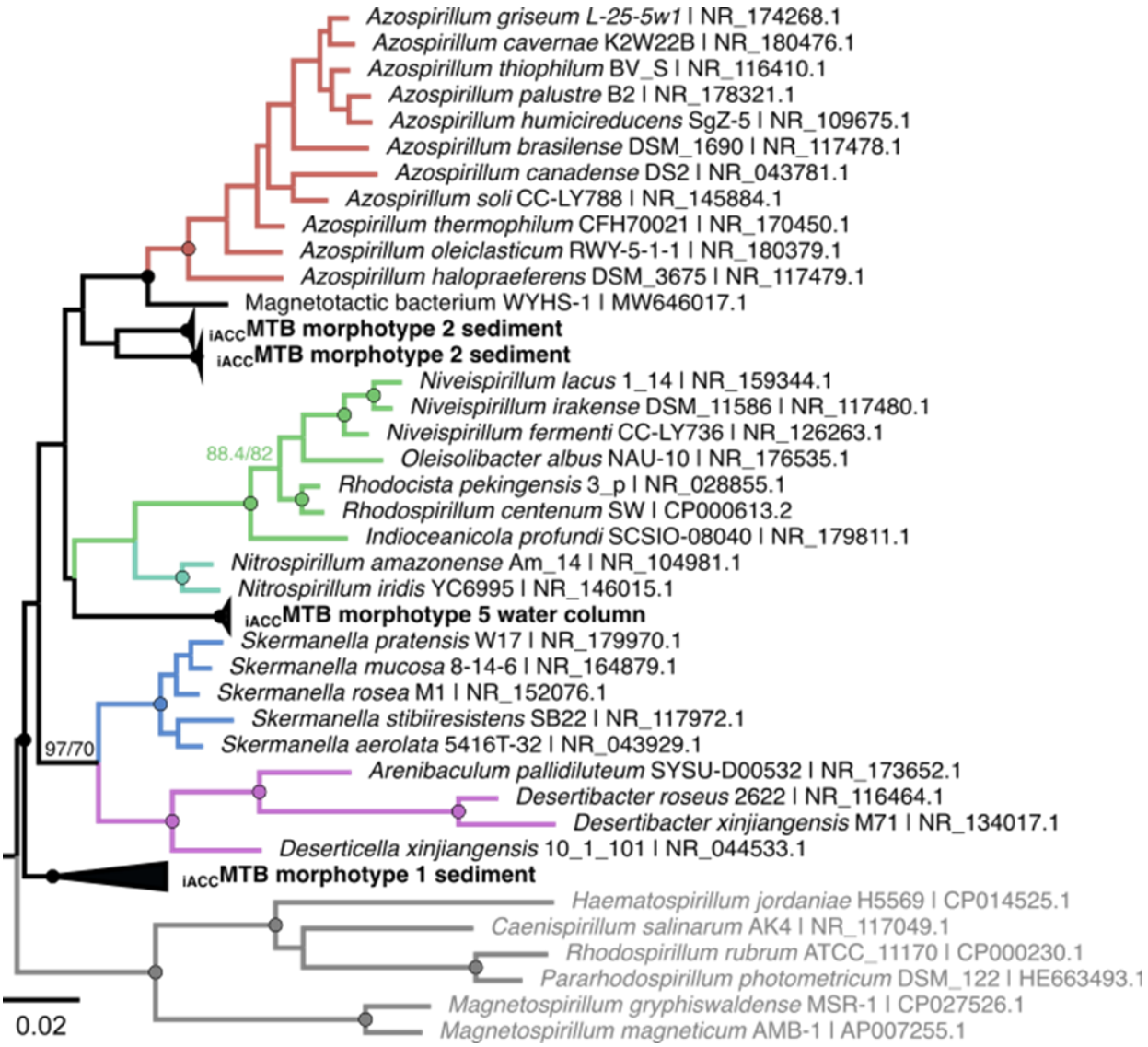


Figure 87 : **Arbre phylogénétique basé sur le gène codant pour l'ARNr 16S montrant les relations des iACCMTB de morphotype 1, 2 (sédiment) et 5 (colonne d'eau) avec les autres souches types décrites au sein de la famille des *Azospirillaceae*.** Arbre construit selon la méthode du maximum de vraisemblance raciné avec des membres représentatifs des *Rhodospirillaceae* (groupe gris). La longueur des branches représente le nombre de substitutions par site. Les cercles sur les nœuds internes représentent le support statistique considéré comme satisfaisant lorsque le taux de vraisemblance (aLRT) est supérieur à 0.95 (estimé de 1000 réplicas) et la valeur de bootstrap non paramétrique est supérieure à 80% (estimée de 500 réplicas). Les iACCMTB sont en gras. La séquence de la bactérie magnétotactique formant des phosphates de calcium WYHS-1 a été également ajoutée (Li et al., 2021). Les numéros d'accession correspondants sont donnés dans le nom des séquences.

Cet arbre pourrait donner l'impression d'une distribution polyphylétique des iACCMTB s'il était soutenu. Mais aucune conclusion ne peut être tirée. Nous avons donc utilisé les génomes représentant les iACCMTB des morphotypes **1**, **2** et **5**. Nous avons inféré l'histoire évolutive des *Azospirillaceae* en utilisant la concaténation des séquences alignées de 120 marqueurs utilisés pour reconstruire la phylogénie globale des bactéries sur laquelle se base la classification GTDB (D. Parks et al., 2018).

Pour la construction du jeu taxonomique initial, nous avons sélectionné uniquement des génomes de souches types dont le taux de complétude était supérieur à 90% et le taux de redondance inférieur à 5%. Si un marqueur était représenté par moins de 90% des génomes, ce marqueur a été écarté. En parallèle, nous avons fait une assignation

taxonomique des génomes de iACCMTB avec GTDB-tk (Chaumeil et al., 2020) pour identifier le(s) genre(s) dans lesquels pourraient être affiliés les iACCMTB. Pour ces groupes taxonomiques GTDB, tous les SAGs ou MAGs publiés ont été intégrés à l'échantillon de départ. Les séquences des 120 marqueurs ont été extraites avec un pipeline développée au laboratoire en utilisant les modèles de Markov Cachés (HMMs) de chaque marqueur. Elles ont ensuite été alignées avec MAFFT (Katoh and Standley, 2013) et concaténées en un seul alignement. Des arbres basés sur le maximum de vraisemblance ont été construits avec IQTREE2 (Minh et al., 2020; Nguyen et al., 2015) et un modèle de substitution sélectionné sur l'alignement global avec ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Un modèle à partition n'a pas été jugé nécessaire ici suite aux premiers résultats.

Etant donné qu'une douzaine des 120 marqueurs seulement étaient présents dans le génome CCP1 du morphotype 1, celui-ci a été exclu du premier arbre car il insère beaucoup trop de données manquantes. Cet arbre bien soutenu sur tous ses nœuds internes profonds a permis de montrer que les **morphotypes 2 et 5 forment un groupe monophylétique** (**Figure 88**). Mais de manière surprenante, ils forment aussi un **groupe monophylétique avec des MAGs issus de la zone anoxique de la colonne d'eau de lacs et étangs chimiquement stratifiés** à Valkea Kotinen en Finlande (VK3_bin-780), Björntjärnen East en Suède (Umea3_bin-0647), à Kuujjuarapik-Whapmagoostui au Canada (C5_bin-1525), ainsi que de la couche active d'un permafrost à Stordalen Mire en Suède (BOG_933) (Buck et al., 2021). Ce groupe est un clade frère à celui formé par le genre *Azospirillum*.

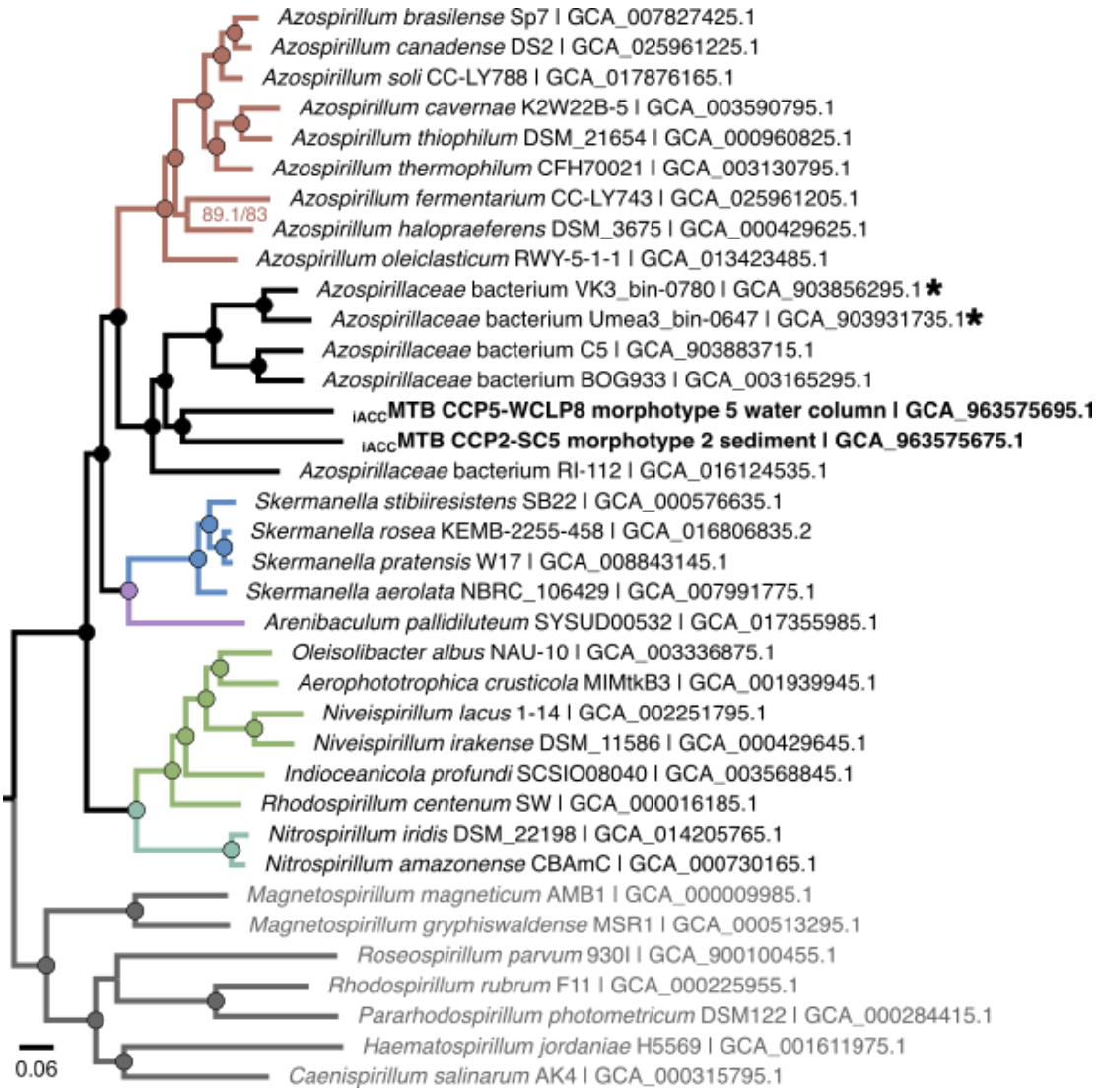


Figure 88 : **Arbre phylogénétique basé sur 114 protéines conservées montrant les relations des iACCMTB de morphotype 2 (sédiment) et 5 (colonne d'eau) avec les autres souches types décrites au sein de la famille des *Azospirillaceae*.** Arbre construit selon la méthode du maximum de vraisemblance raciné avec des membres représentatifs des *Rhodospirillaceae* (groupe gris). La longueur des branches représente le nombre de substitutions par site. Les cercles sur les nœuds internes représentent le support statistique considéré comme satisfaisant lorsque le taux de vraisemblance (aLRT) est supérieur à 0.95 (estimé de 1000 réplicas) et la valeur de bootstrap non paramétrique est supérieure à 80% (estimée de 500 réplicas). Les iACCMTB sont en gras. Les numéros d'accession Genbank correspondants sont donnés dans le nom des séquences. CCP2-SC5 représente les iACCMTB du morphotype 2 et CCP5-WCLP8 représente les iACCMTB du morphotype 5. Les étoiles correspondent aux génomes dans lesquels ont été détectés des gènes codant pour la formation des magnétosomes.

Dans un second arbre, moins bien soutenu sur certains nœuds, car construit sur un nombre de marqueurs bien inférieur, nous avons montré que les iACCMTB du **morphotypes 1 forment un groupe monophylétique avec celles de morphotypes 2 et 5** (**Figure 89**). De manière surprenante, les iACCMTB des morphotypes 2 et 5 partagent un ancêtre commun plus récent que les iACCMTB des morphotypes 1 et 5. Ces relations de parenté entre le morphotype **2** et **5** de iACCMTB sont inattendues, compte tenu de leur présence dans des environnements très différents (respectivement les sédiments et la zone suboxique de la colonne d'eau du lac Pavin) et leurs morphologies très différentes.

Les taux d'identité moyen des protéines et les placements de GTDB-tk soutiennent que les iACCMTB des 3 morphotypes appartiennent tous à trois genres différents au sein de la

famille des *Azospirillaceae,* dont un dans lesquels se regroupent les MAGs cités précédemment. En effet, le pourcentage d'identité moyen sur toutes les protéines des iACCMTB est entre 62 et 65% avec les génomes les plus proches. Un cluster de gènes codant pour la formation des magnétosomes (*Magnetosome Gene Cluster)* a été cherché dans chaque génome et a été détecté dans deux MAGs formant un groupe monophylétique avec CCP1 (*Azospirillaceae* bacterium Umea3_bin-0647 et VK3_bin-0780). L'étude des relations de parenté pour les morphotypes de iACCMTB affiliés à la famille des *Azospirillaceae* souligne l'importance de travailler avec des génomes, plutôt qu'avec un seul marqueur génétique.

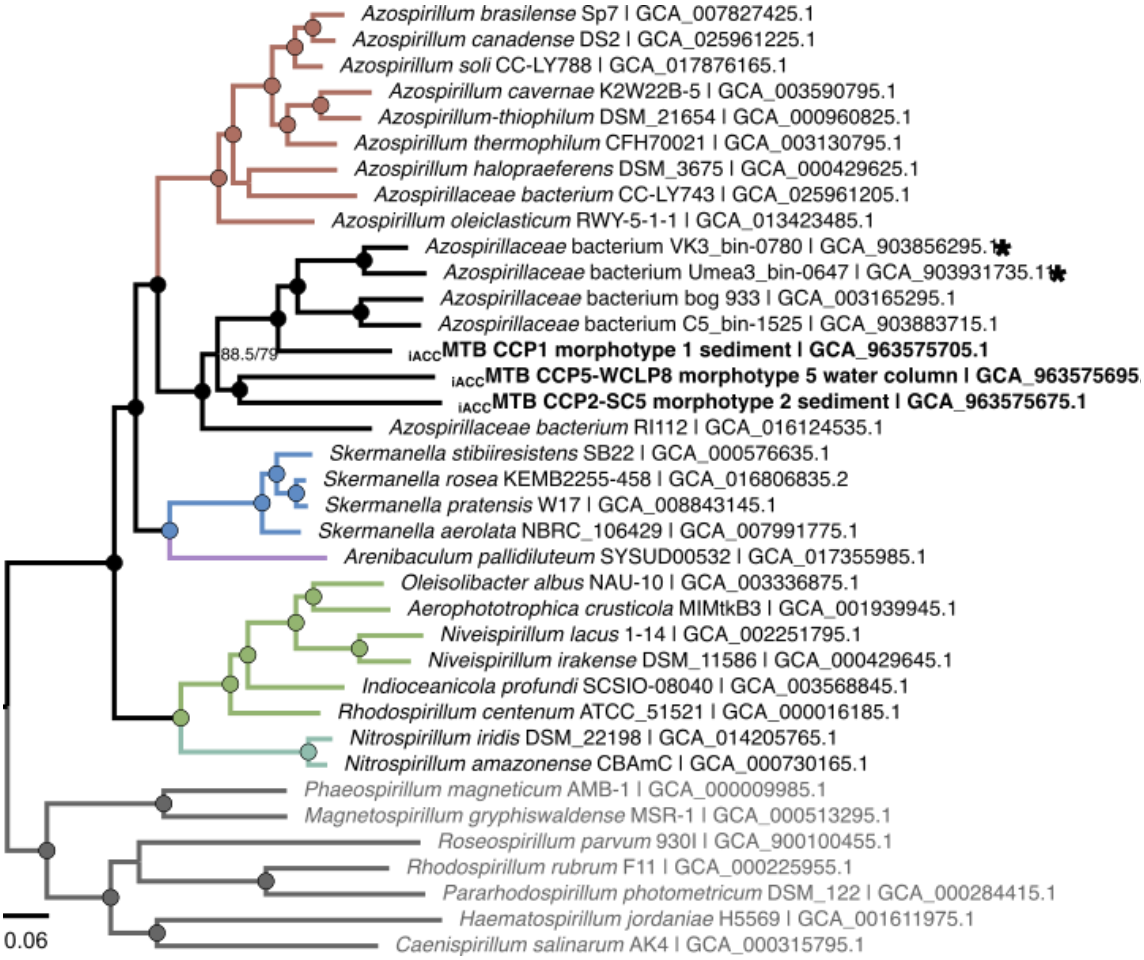


Figure 89 : **Arbre phylogénétique basé sur 43 protéines conservées montrant les relations iACCMTB de morphotype 1 avec les autres iACCMTB.** Arbre construit selon la méthode du maximum de vraisemblance raciné avec des membres représentatifs des *Rhodospirillaceae* (groupe gris). Seulement 12 protéines ont été utilisés pour le génome de CCP1. La longueur des branches représente le nombre de substitutions par site. Les cercles sur les nœuds internes représentent le support statistique considéré comme satisfaisant lorsque le taux de vraisemblance (aLRT) est supérieur à 0.95 (estimé de 1000 réplicas) et la valeur de bootstrap non paramétrique est supérieure à 80% (estimée de 500 réplicas). Les iACCMTB sont en gras. Les numéros d'accession Genbank correspondants sont donnés dans le nom des séquences. Les étoiles correspondent aux génomes dans lesquels ont été détectés des gènes codant pour la formation des magnétosomes selon la classification GTDB.

5.4.2. Diversité des iACCMTB au sein des *Gammaproteobacteria*

Pour rappel, les premières assignations taxonomiques des **morphotypes 3** et **4** (basées sur les alignements via l'outil BLASTN) ont montré une distance génétique importante avec les espèces cultivées les plus proches (cf. **Tableau 3**) affiliées à la classe des ***Gammaproteobacteria*.** Ces résultats suggèrent qu'ils pourraient appartenir à des ordres ou familles, encore non décrites à ce jour. Pour les iACCMTB de ces morphotypes, il a été nécessaire de construire des arbres phylogénomiques avant de faire les arbres basés sur l'ARNr 16S, car il était impossible de connaître les familles et ordres à échantillonner, et surtout la racine. Il est donc nécessaire dans ce cas précis, de construire un arbre des *Gammaproteobacteria* à partir des génomes, pour identifier les ordres et les familles les plus proches avec lesquels se regroupent les iACCMTB. En effet, la classification des *Gammaproteobacteria* n'a pas encore été revisitée comme cela a été fait pour les *Alphaproteobacteria* par Muñoz-Gómez et al., (2019).

C'est pourquoi, un arbre représentant les *Gammaproteobacteria* et positionnant les iACCMTB a été construit dans un premier temps en utilisant les 120 marqueurs protéiques de GTDB et en utilisant les *Alphaproteobacteria* comme racine (**Figure 90**). La même approche et les mêmes méthodes que celles utilisées pour les iACCMTB de la classe des *Alphaproteobacteria* ont été pour construire l'arbre contenant les iACCMTB de la classe des *Gammaproteobacteria*. L'échantillonnage taxonomique a été construit comme suit : un génome de bonne qualité représentant chaque ordre GTDB a été sélectionné au hasard en privilégiant les *representative genomes* en priorité et souches types. Pour les familles identifiées comme potentiellement proches des iACCMTB par analyse BLASTN du gène codant pour l'ARNr 16S, les génomes de deux genres ont été sélectionnés. Enfin, tous les génomes identifiés comme étant dans le même groupe qu'un ou plusieurs iACCMTB ont été ajoutés, même ceux dont le taux de complétude était inférieur à 90%.

La topologie est plutôt très bien soutenue au niveau de toutes les branches internes reliant les ordres et les familles entre eux. On peut noter qu'il existe énormément de MAGs représentant des ordres jamais décrits. **On constate que la formation d'iACC et celle des magnétosomes est polyphylétique contrairement à ce qu'on a pu observer chez les *Azospirillaceae*.** Cet arbre a permis d'identifier les groupes les plus proches des morphotypes **3** et **4** et leur racine respective associée (éléments que nous ignorions totalement au début des analyses). Tous les génomes formant un groupe monophylétique (statistiquement soutenu) avec les 4 génomes de iACCMTB de morphotype 3 ont été sélectionnés pour un arbre de taille plus réduite, ainsi que ceux du groupe monophylétique le plus proche représentant plusieurs ordres GTDB différents pour constituer la racine. Pour le morphotype 4, la sélection fut plus facile, nous avons construit un arbre de la famille des *Chromatiaceae* que nous avons raciné avec la famille du même ordre : les *Sedimenticolaceae*. A partir de cet arbre, il a donc été possible de construire un arbre spécifiquement pour le morphotype **3**, représentant un tout nouvel ordre (**Figure 91A**) et un autre arbre pour le morphotype **4**, appartenant à un nouveau genre dans la

famille des *Chromatiaceae* (**Figure 91B**). Ces arbres donnent la même information que celui principal de la **Figure 90**, mais ils sont plus lisibles et pourront être proposés en figures principales de mon article de thèse en cours de rédaction.

A noter que la bactérie magnétotactique cultivée SS-5 appartient au même ordre que le morphotype **4** de iACCMTB et les cellules représentées par le genre *Achromatium*, mais appartiennent à des familles différentes. Les *Thiohalomonadales* (clade violet) forment également un groupe avec la souche magnétotactique cultivée BW-2, qui elle aussi, représenterait un ordre qui n'a jamais été décrit à ce jour. Toutefois, BW-2 est plus proche du morphotype **3**, et SS-5 est plus proche du morphotype **4** (**Figure 90**). Ainsi, le morphotype 3, le morphotype 4, BW-2 et SS-5 semblent appartenir à des groupes inconnus au sein des *Gammaproteobacteria* qu'il faudra décrire. La souche SS-5 qui a été isolée en culture au laboratoire, est en cours de caractérisation au laboratoire et sera nommée *Thiovirga magnetofrankelii*.

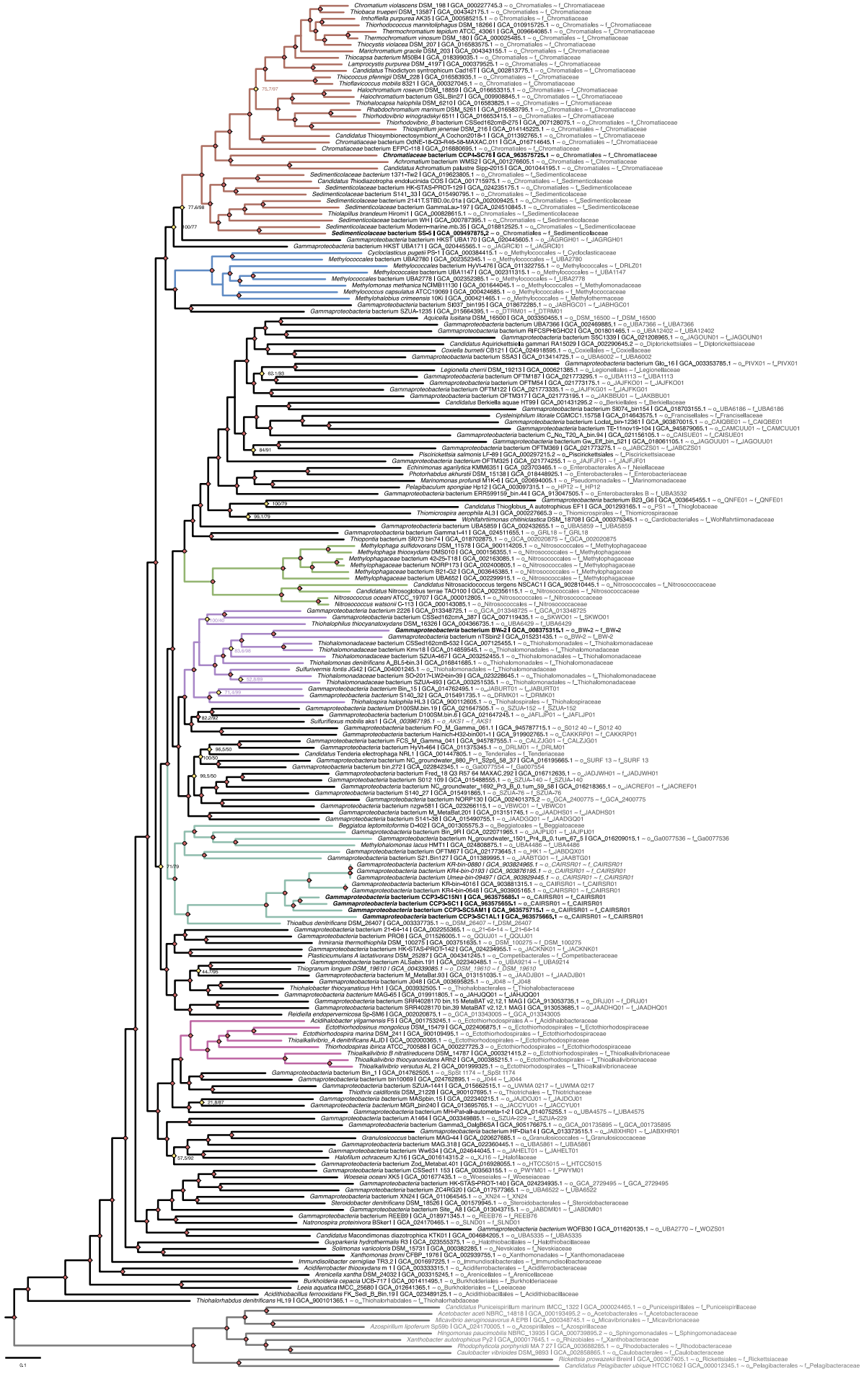

Chromatium violascens DSM_198 | GCA_000227745.3 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Thiohaca truperi DSM_13597 | GCA_004342175.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Imhoffiella purpurea AK35 | GCA_000585215.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Thiorhodococcus mannitoliphagus DSM_18266 | GCA_010915725.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Thermochromatium tepidum ATCC_43061 | GCA_009664085.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Thermochromatium vinosum DSM_180 | GCA_000025485.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Thiocystis violacea DSM_207 | GCA_016583575.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Marichromatium gracile DSM_203 | GCA_004343155.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Thiocapsa bacterium M50B4 | GCA_018399035.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Lamprocystis purpurea DSM_4197 | GCA_000379525.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Candidatus Thiodictyon syntrophicum Cad16T | GCA_002813775.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Thiococcus pfennigii DSM_228 | GCA_016583935.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Thiorhodovibrio winogradskyi 6511 | GCA_016653415.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Thiorhodovibrio_B bacterium CSSed162comB-275 | GCA_007128075.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Thiospirillum jenense DSM_216 | GCA_014145225.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Candidatus Thiosymbionectosymbiont_A Cochon2018-1 | GCA_011392785.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Chromatiaceae bacterium OxNE-18-O3-R46-58-MAXAC.011 | GCA_016714645.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Chromatiaceae bacterium EFPC-118 | GCA_016880695.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Chromatiaceae bacterium CCP4-SC76 | GCA_963575725.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Achromatium bacterium WMS2 | GCA_001276605.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Candidatus Achromatium palustre Sipp-2015 | GCA_001044195.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Chromatiaceae
Sedimenticolaceae bacterium 1371-Tw2 | GCA_019623805.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Sedimenticolaceae
Candidatus Thiodiazotropha endolucinida COS | GCA_001715975.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Sedimenticolaceae
Sedimenticolaceae bacterium HK-STAS-PROT-129 | GCA_024235175.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Sedimenticolaceae
Sedimenticolaceae bacterium S141_33 | GCA_015490795.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Sedimenticolaceae
Sedimenticolaceae bacterium 21417.STBD.0c.01a | GCA_002009425.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Sedimenticolaceae
Sedimenticolaceae bacterium GammaLau-197 | GCA_024510845.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Sedimenticolaceae
Thiolapillus brandeum Hiromi1 | GCA_000828615.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Sedimenticolaceae
Sedimenticolaceae bacterium WH1 | GCA_000787395.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Sedimenticolaceae
Sedimenticolaceae bacterium Modern-marine.mb.35 | GCA_018812525.1 ~ o_Chromatiales ~ f_Sedimenticolaceae
Sedimenticolaceae bacterium SS-5 | GCA_009497875.2 ~ o_Chromatiales ~ f_Sedimenticolaceae
Gammaproteobacteria bacterium HKST UBA170 | GCA_020445605.1 ~ o_JAGRGH01 ~ f_JAGRGH01
Gammaproteobacteria bacterium HKST UBA171 | GCA_020445565.1 ~ o_JAGRCI01 ~ f_JAGRCI01
Cycloclasticus pugetii PS-1 | GCA_000384415.1 ~ o_Methylococcales ~ f_Cycloclasticaceae
Methylococcales bacterium UBA2780 | GCA_002352345.1 ~ o_Methylococcales ~ f_UBA2780
Methylococcales bacterium HyVt-476 | GCA_011322755.1 ~ o_Methylococcales ~ f_DRLZ01
Methylococcales bacterium UBA1147 | GCA_002311315.1 ~ o_Methylococcales ~ f_UBA1147
Methylococcales bacterium UBA2778 | GCA_002352385.1 ~ o_Methylococcales ~ f_UBA2778
Methylomonas methanica NCIMB11130 | GCA_001644045.1 ~ o_Methylococcales ~ f_Methylomonadaceae
Methylococcus capsulatus ATCC19069 | GCA_000424685.1 ~ o_Methylococcales ~ f_Methylococcaceae
Methylohalobius crimeensis 10Ki | GCA_000421465.1 ~ o_Methylococcales ~ f_Methylothermaceae
Gammaproteobacteria bacterium SI037_bin195 | GCA_019672285.1 ~ o_JABHGC01 ~ f_JABHGC01
Gammaproteobacteria bacterium SZUA-1235 | GCA_015664395.1 ~ o_DTRM01 ~ f_DTRM01
Aquicella lusitana DSM_16500 | GCA_003350455.1 ~ o_DSM_16500 ~ f_DSM_16500
Gammaproteobacteria bacterium UBA7366 | GCA_002469885.1 ~ o_UBA7366 ~ f_UBA7366
Gammaproteobacteria bacterium RifCSPHIGHO2 | GCA_001801465.1 ~ o_UBA12402 ~ f_UBA12402
Gammaproteobacteria bacterium SSC1339 | GCA_021208965.1 ~ o_JAGOUN01 ~ f_JAGOUN01
Candidatus Aquirickettsiella gammari RA15029 | GCA_002290645.2 ~ o_Diplorickettsiales ~ f_Diplorickettsiaceae
Coxiella burnetii CB121 | GCA_024918595.1 ~ o_Coxiellales ~ f_Coxiellaceae
Gammaproteobacteria bacterium SSA3 | GCA_013414725.1 ~ o_UBA6002 ~ f_UBA6002
Gammaproteobacteria bacterium Glo_16 | GCA_003353785.1 ~ o_PIVX01 ~ f_PIVX01
Legionella cherrii DSM_19213 | GCA_000621385.1 ~ o_Legionellales ~ f_Legionellaceae
Gammaproteobacteria bacterium OFTM187 | GCA_021773295.1 ~ o_UBA1113 ~ f_UBA1113
Gammaproteobacteria bacterium OFTM54 | GCA_021773175.1 ~ o_JAJFKO01 ~ f_JAJFKO01
Gammaproteobacteria bacterium OFTM122 | GCA_021773335.1 ~ o_JAJFKG01 ~ f_JAJFKG01
Gammaproteobacteria bacterium OFTM317 | GCA_021775195.1 ~ o_JAKBBU01 ~ f_JAKBBU01
Candidatus Berkiella aquae HT99 | GCA_001431295.2 ~ o_Berkiellales ~ f_Berkiellaceae
Gammaproteobacteria bacterium SI074_bin154 | GCA_018703155.1 ~ o_UBA6186 ~ f_UBA6186
Cysteiniphilum litorale CGMCC1.15758 | GCA_014643575.1 ~ o_Francisellales ~ f_Francisellaceae
Gammaproteobacteria bacterium LocBal_bin-12361 | GCA_903870015.1 ~ o_CAIQBE01 ~ f_CAIQBE01
Gammaproteobacteria bacterium TE-11nov19-104 | GCA_945879065.1 ~ o_CAMCUU01 ~ f_CAMCUU01
Gammaproteobacteria bacterium C_No_T20_A_bin.94 | GCA_021156105.1 ~ o_CAISUE01 ~ f_CAISUE01
Gammaproteobacteria bacterium Gw_Elf_bin_521 | GCA_018061105.1 ~ o_JAGOUU01 ~ f_JAGOUU01
Gammaproteobacteria bacterium OFTM369 | GCA_021773275.1 ~ o_JABCZS01 ~ f_JABCZS01
Piscirickettsia salmonis LF-89 | GCA_002297215.2 ~ o_Piscirickettsiales ~ f_Piscirickettsiaceae
Gammaproteobacteria bacterium OFTM325 | GCA_021774255.1 ~ o_JAJFJF01 ~ f_JAJFJF01
Echinimonas agariliytica KMM6351 | GCA_023703485.1 ~ o_Enterobacterales A ~ f_Nevskiaceae
Photorhabdus akhurstii DSM_15138 | GCA_018448925.1 ~ o_Enterobacterales ~ f_Enterobacteriaceae
Marinomonas profundi M1K-6 | GCA_020694005.1 ~ o_Pseudomonadales ~ f_Marinomonadaceae
Pelagibaculum spongiae Hp12 | GCA_003097315.1 ~ o_HP12 ~ f_HP12
Gammaproteobacteria bacterium ERR599159_bin.44 | GCA_913047505.1 ~ o_Enterobacterales B ~ f_UBA3532
Gammaproteobacteria bacterium B23_G6 | GCA_003645455.1 ~ o_QNFE01 ~ f_QNFE01
Candidatus Thioglobus_A autotrophicus EF1 | GCA_001293165.1 ~ o_PS1 ~ f_Thioglobaceae
Thiomicrospira aerophila AL3 | GCA_000227665.3 ~ o_Thiomicrospirales ~ f_Thiomicrospiraceae
Wohlfahrtiimonas chitiniclastica DSM_18708 | GCA_000375345.1 ~ o_Cardiobacteriales ~ f_Wohlfahrtiimonadaceae
Gammaproteobacteria bacterium UBA5859 | GCA_002432655.1 ~ o_UBA5859 ~ f_UBA5859
Gammaproteobacteria bacterium Gamma1-41 | GCA_024511655.1 ~ o_GRL18 ~ f_GRL18
Thiopontia bacterium SI073 bin74 | GCA_018702875.1 ~ o_GCA_002020875 ~ f_GCA_002020875
Methylophaga sulfidovorans DSM_11578 | GCA_900114205.1 ~ o_Nitrosococcales ~ f_Methylophagaceae
Methylophaga thiooxydans DMS010 | GCA_000156355.1 ~ o_Nitrosococcales ~ f_Methylophagaceae
Methylophagaceae bacterium 42-25-T18 | GCA_002163085.1 ~ o_Nitrosococcales ~ f_Methylophagaceae
Methylophagaceae bacterium NORP173 | GCA_002400805.1 ~ o_Nitrosococcales ~ f_Methylophagaceae
Methylophagaceae bacterium B21-G2 | GCA_003645385.1 ~ o_Nitrosococcales ~ f_Methylophagaceae
Methylophagaceae bacterium UBA652 | GCA_002299915.1 ~ o_Nitrosococcales ~ f_Methylophagaceae
Candidatus Nitrosacidococcus tergens NSCAC1 | GCA_902810445.1 ~ o_Nitrosococcales ~ f_Nitrosococcaceae
Candidatus Nitrosoglobus terrae TAO100 | GCA_002356115.1 ~ o_Nitrosococcales ~ f_Nitrosococcaceae
Nitrosococcus oceani ATCC_19707 | GCA_000012905.1 ~ o_Nitrosococcales ~ f_Nitrosococcaceae
Nitrosococcus watsonii C-113 | GCA_000143085.1 ~ o_Nitrosococcales ~ f_Nitrosococcaceae
Gammaproteobacteria bacterium 2226 | GCA_013348725.1 ~ o_GCA_013348725 ~ f_GCA_013348725
Gammaproteobacteria bacterium CSSed162comA_387 | GCA_007119435.1 ~ o_SKWO01 ~ f_SKWO01
Thiohalophilus thiocyanatoxydans DSM_16326 | GCA_004366735.1 ~ o_UBA6429 ~ f_UBA6429
Gammaproteobacteria bacterium BW-2 | GCA_003375315.1 ~ o_BW-2 ~ f_BW-2
Gammaproteobacteria bacterium nTSbin2 | GCA_015231435.1 ~ o_BW-2 ~ f_BW-2
Thiohalomonadaceae bacterium CSSed162cmB-532 | GCA_007125455.1 ~ o_Thiohalomonadales ~ f_Thiohalomonadaceae
Thiohalomonadaceae bacterium Kmv18 | GCA_014859545.1 ~ o_Thiohalomonadales ~ f_Thiohalomonadaceae
Thiohalomonadaceae bacterium SZUA-467 | GCA_003252455.1 ~ o_Thiohalomonadales ~ f_Thiohalomonadaceae
Thiohalomonas denitrificans A_BL5-bin.3 | GCA_016841685.1 ~ o_Thiohalomonadales ~ f_Thiohalomonadaceae
Sulfurivermis fontis JG42 | GCA_004001245.1 ~ o_Thiohalomonadales ~ f_Thiohalomonadaceae
Thiohalomonadaceae bacterium SD-2017-LW2-bin-39 | GCA_023328645.1 ~ o_Thiohalomonadales ~ f_Thiohalomonadaceae
Thiohalomonadaceae bacterium SZUA-493 | GCA_003251535.1 ~ o_Thiohalomonadales ~ f_Thiohalomonadaceae
Gammaproteobacteria bacterium Bin_15 | GCA_014762495.1 ~ o_JABJRT01 ~ f_JABJRT01
Gammaproteobacteria bacterium S140_32 | GCA_015491735.1 ~ o_DRMK01 ~ f_DRMK01
Thiohalospira halophila HL3 | GCA_900112605.1 ~ o_Thiohalospirales ~ f_Thiohalospiraceae
Gammaproteobacteria bacterium D100SM.bin.19 | GCA_021647505.1 ~ o_SZUA-152 ~ f_SZUA-152
Gammaproteobacteria bacterium D100SM.bin.6 | GCA_021647245.1 ~ o_JAFLJP01 ~ f_JAFLJP01
Sulfuriflexus mobilis aks1 | GCA_003967195.1 ~ o_AKS1 ~ f_AKS1
Gammaproteobacteria bacterium FO_M_Gamma_061.1 | GCA_945787715.1 ~ o_S012 40 ~ f_S012 40
Gammaproteobacteria bacterium Hainich-H32-bin001-1 | GCA_919902765.1 ~ o_CAKKRP01 ~ f_CAKKRP01
Gammaproteobacteria bacterium FCS_M_Gamma_041 | GCA_945787555.1 ~ o_CALZJG01 ~ f_CALZJG01
Gammaproteobacteria bacterium HyVt-464 | GCA_011375345.1 ~ o_DRLM01 ~ f_DRLM01
Candidatus Tenderia electrophaga NRL1 | GCA_001447805.1 ~ o_Tenderiales ~ f_Tenderiaceae
Gammaproteobacteria bacterium NC_groundwater_880_Pr1_82p5_58_37 | GCA_016195665.1 ~ o_SURF 13 ~ f_SURF 13
Gammaproteobacteria bacterium bin_272 | GCA_022842345.1 ~ o_Ga0077554 ~ f_Ga0077554
Gammaproteobacteria bacterium Fred_18 Q3 R57 64 MAXAC.292 | GCA_016712635.1 ~ o_JADJWH01 ~ f_JADJWH01
Gammaproteobacteria bacterium S012 109 | GCA_015488555.1 ~ o_SZUA-140 ~ f_SZUA-140
Gammaproteobacteria bacterium NC_groundwater_1692_Pr3_B_0.1um_59_58 | GCA_016218365.1 ~ o_JACREF01 ~ f_JACREF01
Gammaproteobacteria bacterium S140_27 | GCA_015491865.1 ~ o_SZUA-76 ~ f_SZUA-76
Gammaproteobacteria bacterium NORP130 | GCA_002401575.2 ~ o_GCA_2400775 ~ f_GCA_2400775
Gammaproteobacteria bacterium rizgw581 | GCA_002366115.1 ~ o_VBWC01 ~ f_VBWC01
Gammaproteobacteria bacterium M_MetaBat.201 | GCA_013151745.1 ~ o_JAADHS01 ~ f_JAADHS01
Gammaproteobacteria bacterium S141-38 | GCA_015490755.1 ~ o_JAADGQ01 ~ f_JAADGQ01
Beggiatoa leptomitoformis D-402 | GCA_001305575.3 ~ o_Beggiatoales ~ f_Beggiatoaceae
Gammaproteobacteria bacterium Bin_9R1 | GCA_022071965.1 ~ o_JAJFJU01 ~ f_JAJFJU01
Gammaproteobacteria bacterium N_groundwater_1501_Pr4_B_0.1um_67_5 | GCA_016209015.1 ~ o_Ga0077536 ~ f_Ga0077536
Methylohalomonas lacus HMT1 | GCA_024808875.1 ~ o_UBA4486 ~ f_UBA4486
Gammaproteobacteria bacterium OFTM67 | GCA_021773645.1 ~ o_HK1 ~ f_JABDQX01
Gammaproteobacteria bacterium S21.Bin127 | GCA_013389995.1 ~ o_JAABTG01 ~ f_JAABTG01
Gammaproteobacteria bacterium KR-bin-0880 | GCA_903824865.1 ~ o_CAIRSR01 ~ f_CAIRSR01
Gammaproteobacteria bacterium KR4-bin-0193 | GCA_903876195.1 ~ o_CAIRSR01 ~ f_CAIRSR01
Gammaproteobacteria bacterium Umea-bin-09497 | GCA_903829445.1 ~ o_CAIRSR01 ~ f_CAIRSR01
Gammaproteobacteria bacterium KR-bin-4016 | GCA_903881315.1 ~ o_CAIRSR01 ~ f_CAIRSR01
Gammaproteobacteria bacterium KR4-bin-0648 | GCA_903905165.1 ~ o_CAIRSR01 ~ f_CAIRSR01
Gammaproteobacteria bacterium CCP3-SC1SN1 | GCA_963575685.1 ~ o_CAIRSR01 ~ f_CAIRSR01
Gammaproteobacteria bacterium CCP3-SC1 | GCA_963575655.1 ~ o_CAIRSR01 ~ f_CAIRSR01
Gammaproteobacteria bacterium CCP5-SC5AM1 | GCA_963575715.1 ~ o_CAIRSR01 ~ f_CAIRSR01
Gammaproteobacteria bacterium CCP3-SC1AL1 | GCA_963575665.1 ~ o_CAIRSR01 ~ f_CAIRSR01
Thioalbus denitrificans DSM_26407 | GCA_003337735.1 ~ o_DSM_26407 ~ f_DSM_26407
Gammaproteobacteria bacterium 21-64-14 | GCA_002255985.1 ~ o_21-64-14 ~ f_21-64-14
Gammaproteobacteria bacterium PRO8 | GCA_011526005.1 ~ o_QQUJ01 ~ f_QQUJ01
Immirania thermothiophila DSM_100275 | GCA_003751635.1 ~ o_DSM_100275 ~ f_DSM_100275
Gammaproteobacteria bacterium HK-STAS-PROT-142 | GCA_024234955.1 ~ o_JACKNK01 ~ f_JACKNK01
Plasticicumulans A lactativorans DSM_25287 | GCA_004341245.1 ~ o_Competibacterales ~ f_Competibacteraceae
Gammaproteobacteria bacterium ALSabin.191 | GCA_022340485.1 ~ o_UBA9214 ~ f_UBA9214
Thiogranum longum DSM_19610 | GCA_004339085.1 ~ o_DSM_19610 ~ f_DSM_19610
Gammaproteobacteria bacterium M_MetaBat.93 | GCA_013151035.1 ~ o_JAADJB01 ~ f_JAADJB01
Gammaproteobacteria bacterium J048 | GCA_003695825.1 ~ o_J048 ~ f_J048
Thiohalobacter thiocyanaticus Hrh1 | GCA_003932505.1 ~ o_Thiohalobacterales ~ f_Thiohalobacteraceae
Gammaproteobacteria bacterium MAG-65 | GCA_019911805.1 ~ o_JAHJQO01 ~ f_JAHJQO01
Gammaproteobacteria bacterium SRR4028170 bin.15 MetaBAT v2.12.1 MAG | GCA_913053735.1 ~ o_DRJJ01 ~ f_DRJJ01
Gammaproteobacteria bacterium SRR4028170 bin.39 MetaBAT v2.12.1 MAG | GCA_913053685.1 ~ o_JAADHQ01 ~ f_JAADHQ01
Reidiella endopervernicosa Sp-SM6 | GCA_002020875.1 ~ o_GCA_013343005 ~ f_GCA_013343005
Acidihalobacter yilgarnensis F5 | GCA_001753245.1 ~ o_Ectothiorhodospirales A ~ f_Acidihalobacteraceae
Ectothiorhodosinus mongolicus DSM_15479 | GCA_022406875.1 ~ o_Ectothiorhodospirales ~ f_Ectothiorhodospiraceae
Ectothiorhodospira marina DSM_241 | GCA_900109495.1 ~ o_Ectothiorhodospirales ~ f_Ectothiorhodospiraceae
Thioalkalivibrio_A denitrificans ALJD | GCA_002000365.1 ~ o_Ectothiorhodospirales ~ f_Ectothiorhodospiraceae
Thiorhodospira ibirica ATCC_700588 | GCA_002277725.3 ~ o_Ectothiorhodospirales ~ f_Ectothiorhodospiraceae
Thioalkalivibrio B nitratireducens DSM_14787 | GCA_000321415.2 ~ o_Ectothiorhodospirales ~ f_Thioalkalivibrionaceae
Thioalkalivibrio thiocyanoxidans ARh2 | GCA_000385215.1 ~ o_Ectothiorhodospirales ~ f_Thioalkalivibrionaceae
Thioalkalivibrio versutus AL 2 | GCA_001999325.1 ~ o_Ectothiorhodospirales ~ f_Thioalkalivibrionaceae
Gammaproteobacteria bacterium Bin_1 | GCA_014762505.1 ~ o_SpSt 1174 ~ f_SpSt 1174
Gammaproteobacteria bacterium bin10069 | GCA_024762895.1 ~ o_J044 ~ f_J044
Gammaproteobacteria bacterium SZUA-1441 | GCA_015662515.1 ~ o_UWMA 0217 ~ f_UWMA 0217
Thiothrix caldifontis DSM_21228 | GCA_900107695.1 ~ o_Thiotrichales ~ f_Thiotrichaceae
Gammaproteobacteria bacterium MASpbin.15 | GCA_022340215.1 ~ o_JAJDOJ01 ~ f_JAJDOJ01
Gammaproteobacteria bacterium MGR_bin240 | GCA_013695765.1 ~ o_JACCYU01 ~ f_JACCYU01
Gammaproteobacteria bacterium MH-Pat-salt-meteo-1r2 | GCA_014075255.1 ~ o_UBA4575 ~ f_UBA4575
Gammaproteobacteria bacterium A1464 | GCA_003349885.1 ~ o_SZUA-229 ~ f_SZUA-229
Gammaproteobacteria bacterium Gamma3_Oalg86SA | GCA_905176675.1 ~ o_GCA_001735895 ~ f_GCA_001735895
Gammaproteobacteria bacterium HF-Dia14 | GCA_013373515.1 ~ o_JABXHR01 ~ f_JABXHR01
Granulosicoccus bacterium MAG-44 | GCA_020627685.1 ~ o_Granulosicoccales ~ f_Granulosicoccaceae
Gammaproteobacteria bacterium MAG.318 | GCA_022360445.1 ~ o_UBA5861 ~ f_UBA5861
Gammaproteobacteria bacterium Wwt84 | GCA_024644045.1 ~ o_JAHELT01 ~ f_JAHELT01
Halofilum ochraceum XJ16 | GCA_001614315.2 ~ o_XJ16 ~ f_Halofilaceae
Gammaproteobacteria bacterium Zod_Metabat.401 | GCA_016928055.1 ~ o_HTCC5015 ~ f_HTCC5015
Gammaproteobacteria bacterium CSSed11 153 | GCA_003563155.1 ~ o_PWYM01 ~ f_PWYM01
Woeseia oceani XK5 | GCA_001677435.1 ~ o_Woeseiales ~ f_Woeseiaceae
Gammaproteobacteria bacterium HK-STAS-PROT-140 | GCA_024234955.1 ~ o_GCA_2729495 ~ f_GCA_2729495
Gammaproteobacteria bacterium ZC4RG20 | GCA_017577365.1 ~ o_UBA6522 ~ f_UBA6522
Gammaproteobacteria bacterium XN24 | GCA_011064545.1 ~ o_XN24 ~ f_XN24
Steroidobacter denitrificans DSM_18526 | GCA_001579945.1 ~ o_Steroidobacterales ~ f_Steroidobacteraceae
Gammaproteobacteria bacterium Site_A8 | GCA_013043715.1 ~ o_JABDMI01 ~ f_JABDMI01
Gammaproteobacteria bacterium REEB9 | GCA_018971345.1 ~ o_REEB76 ~ f_REEB76
Natronospira proteinivora BSker1 | GCA_024170465.1 ~ o_SLND01 ~ f_SLND01
Gammaproteobacteria bacterium WOFB30 | GCA_011620135.1 ~ o_UBA2770 ~ f_WOZS01
Candidatus Macondimonas diazotrophica KTK01 | GCA_004684205.1 ~ o_UBA5335 ~ f_UBA5335
Guyparkeria hydrothermalis R8 | GCA_003553575.1 ~ o_Halothiobacillales ~ f_Halothiobacillaceae
Solimonas variicolora DSM_15731 | GCA_000382285.1 ~ o_Nevskiales ~ f_Nevskiaceae
Xanthomonas bromi CFBP_1976 | GCA_002939755.1 ~ o_Xanthomonadales ~ f_Xanthomonadaceae
Immundisolibacter cernigliae TR3.2 | GCA_001697235.1 ~ o_Immundisolibacterales ~ f_Immundisolibacteraceae
Acidiferrobacter thiooxydans m 1 | GCA_003333315.1 ~ o_Acidiferrobacterales ~ f_Acidiferrobacteraceae
Arenicella xantha DSM_24032 | GCA_003315245.1 ~ o_Arenicellales ~ f_Arenicellaceae
Burkholeria cepacia UCB-717 | GCA_001411495.1 ~ o_Burkholderiales ~ f_Burkholderiaceae
Leeia aquatica IMCC_25680 | GCA_012641365.1 ~ o_Burkholderiales ~ f_Leeiaceae
Acidithiobacillus ferrooxidans FK_SedI_B_Bin.19 | GCA_023489125.1 ~ o_Acidithiobacillales ~ f_Acidithiobacillaceae
Thiohalorhabdus denitrificans HL19 | GCA_900101365.1 ~ o_Thiohalorhabdales ~ f_Thiohalorhabdaceae
Candidatus Puniceispirillum marinum IMCC_1322 | GCA_000024665.1 ~ o_Puniceispirillales ~ f_Puniceispirillaceae
Acetobacter aceti NBRC_14818 | GCA_000193495.2 ~ o_Acetobacterales ~ f_Acetobacteraceae
Micavibrio aeruginosavorus A EPB | GCA_000348745.1 ~ o_Micavibrionales ~ f_Micavibrionaceae
Azospirillum lipoferum Sp59b | GCA_024170005.1 ~ o_Azospirillales ~ f_Azospirillaceae
Hingomonas paucimobilis NBRC_13935 | GCA_000739895.1 ~ o_Sphingomonadales ~ f_Sphingomonadaceae
Xanthobacter autotrophicus Py2 | GCA_000017645.1 ~ o_Rhizobiales ~ f_Xanthobacteraceae
Rhodophyllicola porphyridii MA 7 27 | GCA_003688265.1 ~ o_Rhodobacterales ~ f_Rhodobacteraceae
Caulobacter vibrioides DSM_9893 | GCA_002858865.1 ~ o_Caulobacterales ~ f_Caulobacteraceae
Rickettsia prowazekii Brein1 | GCA_000367405.1 ~ o_Rickettsiales ~ f_Rickettsiaceae
Candidatus Pelagibacter ubique HTCC1062 | GCA_000012345.1 ~ o_Pelagibacterales ~ f_Pelagibacteraceae
75.7/97
77.6/98
100/77
62.1/93
94/91
100/79
99.1/79
100/49
83.6/98
82.8/89
71.4/89
82.2/92
96.5/50
100/50
99.5/50
71/79
44.7/95
21.4/83
57.6/92
0.1

Figure 90 : **Arbre phylogénétique des *Gammaproteobacteria* basé sur 120 protéines.** Arbre construit selon la méthode du maximum de vraisemblance raciné avec des membres représentatifs des *Alphaproteobacteria* (groupe gris). La longueur des branches représente le nombre de substitutions par site. Les cercles sur les nœuds internes représentent le support statistique considéré comme satisfaisant lorsque le taux de vraisemblance (aLRT) est supérieur à 0.95 (estimé de 1000 réplicas) et la valeur de bootstrap non paramétrique est supérieure à 80% (estimée de 500 réplicas). Les iACCMTB ainsi que les deux souches de MTB cultivées sont en gras. Quelques couleurs permettent de mettre en évidence certains ordres importants dans notre étude. Les numéros d'accession Genbank correspondants sont donnés dans le nom des séquences, ainsi que le nom de l'ordre « o_ » et de la famille « f_ » correspondants dans GTDB. Deux arbres avec un échantillonnage plus réduit ont été construits à partir du clade en turquoise (**Figure 94A**, positionnant les iACCMTB du morphotype 3) et du clade en marron (**Figure 94B**, positionnant les iACCMTB du morphotype 4).

L'arbre des iACCMTB du **morphotype 3** ne montre pas de relation de parenté de ce morphotype avec des bactéries de familles ou ordres connus. Le morphotype 3 appartiendrait à un ordre proposé par GTDB mais qui n'est pas encore validé, actuellement nommé CAIRSR01. De manière intéressante, comme pour les *Azospirillaceae*, toutes **les iACCMTB du morphotype 3 forment un groupe monophylétique avec des MAGs issus de la zone anoxique de la colonne d'eau de lacs et étangs chimiquement stratifiés** à Keskinen Rajajärvien et Keskinen Rajajärvi en Finlande (KR-bin-0880 / KR-bin-4016 et KR4-bin-0648 / KR4-bin-0193, respectivement), et à Björntjärnen East en Suède (Umea-bin-09497) (Buck et al., 2021) (**Figure 91A**). Les génomes les plus proches de ceux des iACCMTB sont donc encore une fois des génomes associés à des MTB non cultivées dans lequel nous avons détecté un MGC.

Les taux d'identité moyen des protéines et les placements de GTDB-tk soutiennent que les iACCMTB du morphotype 3 appartiennent à plusieurs espèces et peut être genres différents non décrits au sein de l'ordre non décrit des CAIRSR01 des *Gammaproteobacteria*. Cet ordre est représenté uniquement par des bactéries isolées de lacs et étangs chimiquement stratifiés dans l'hémisphère nord et toutes seraient magnétotactiques. En effet, le pourcentage d'identité moyen des protéines (AAI) de tous les génomes entre eux se situe entre 69 et 75%. Les deux genres de bactéries les plus proches avec des représentants cultivés se trouvent dans la racine. On trouve le genre *Beggiatoa* représenté par des bactéries sulfo-oxydantes formant des granules de soufre intracellulaire et appartenant à la famille des *Thiotrichaceae* dans la classification actuelle mais formant son propre ordre dans celle de *GTDB*. On trouve également le genre *Methylohalomonas* (Sorokin et al., 2007), un nouveau genre bactérien proposé appartenant à un ordre de *Gammaproteobacteria incertae sedis* donc non classé, associé à des bactéries méthylotrophes (**Figure 91A**).

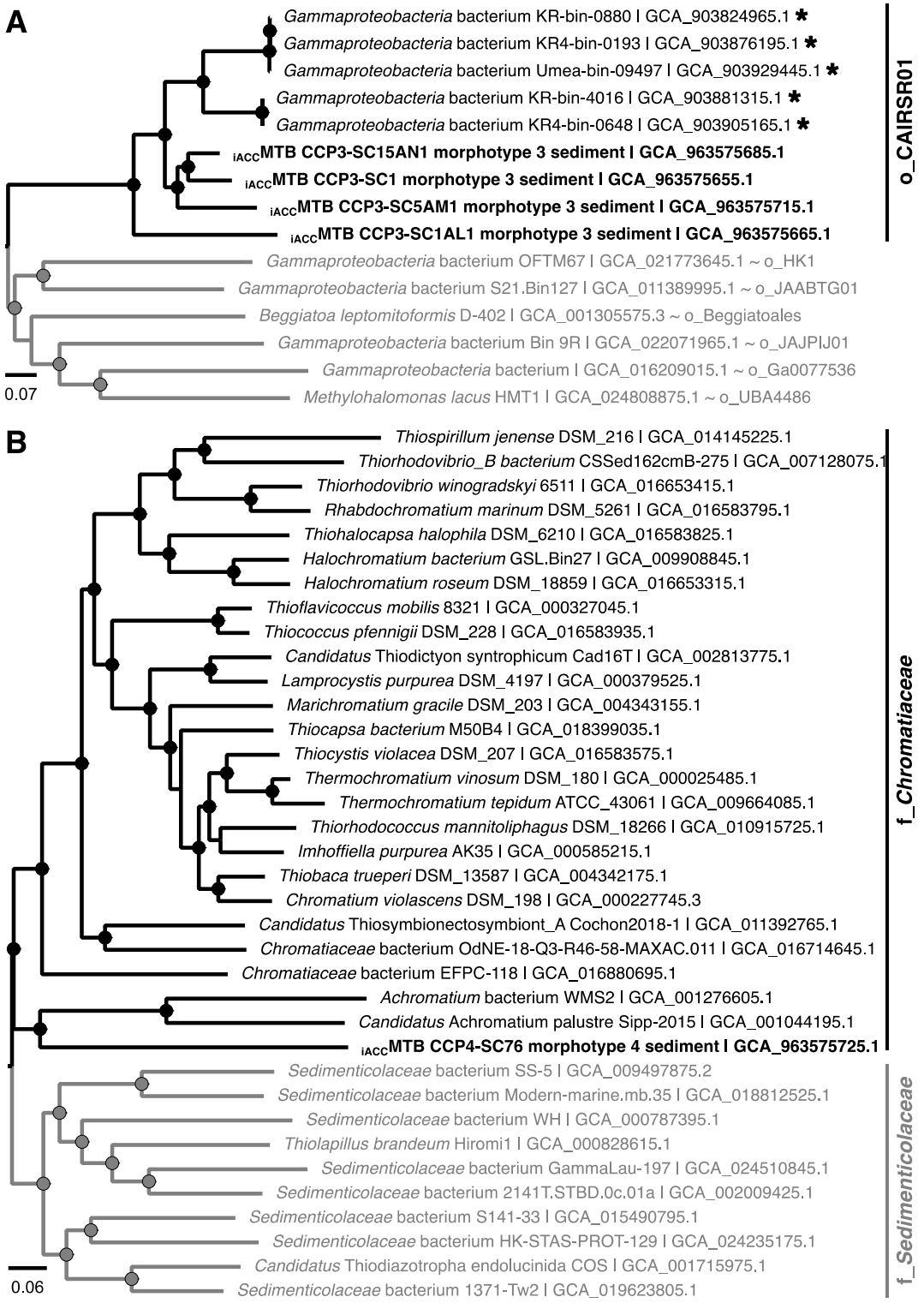


Figure 91 : **Arbre phylogénétique basé sur 120 protéines conservées montrant les relations des iACCMTB de morphotypes 3 et 4 (sédiment) au sein de (A) l'ordre des CAIRSR01 et (B) de la famille des *Chromatiaceae,* respectivement.** Arbres construits selon la méthode du maximum de vraisemblance. Les racines sont en gris. La longueur des branches représente le nombre de substitutions par site. Les cercles sur les nœuds internes représentent le support statistique considéré comme satisfaisant lorsque le taux de vraisemblance (aLRT) est supérieur à 0.95 (estimé de 1000 réplicas) et la valeur de bootstrap non paramétrique est supérieure à 80% (estimée de 500 réplicas). Les iACCMTB sont en gras. Les numéros d'accession Genbank correspondants sont donnés dans le nom des séquences. Les étoiles correspondent aux génomes dans lesquels ont été détectés des gènes codant pour la formation des magnétosomes.

Nous avons voulu connaître les relations de parenté entre les bactéries des lacs chimiquement stratifiés dont le lac Pavin et la bactérie magnétotactique GRS-1 formant des corps riches en calcium (Taoka et al., 2014). Nous avons construit un arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ADNr 16S d'un échantillon d'organismes similaires au morphotype 3. Cet arbre (**Figure 92**) a permis de confirmer que la MTB GRS-1 appartient à la même espèce représentée par la séquence CCP3-2020_07_09 (OR762250.1). Il est donc très probable que les inclusions riches en calcium décrits par Taoka *et al* chez la bactérie GRS-1 soient des iACC.

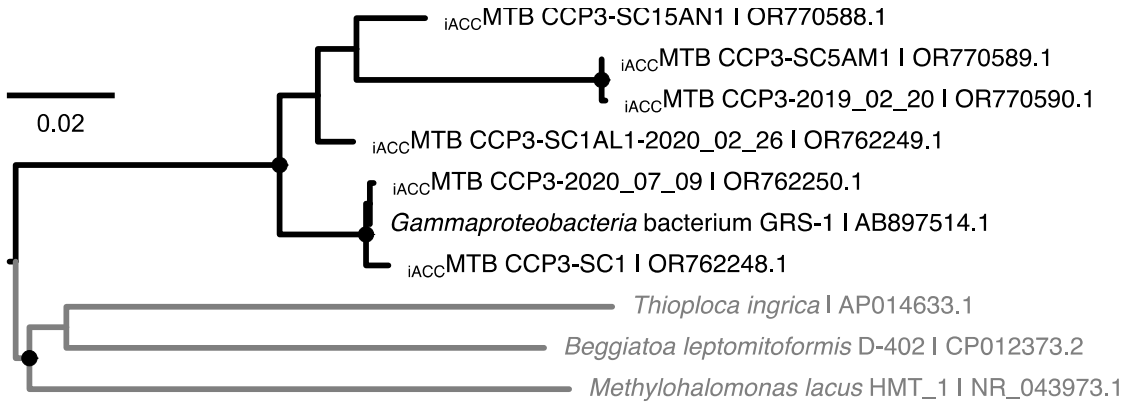


Figure 92 : **Arbre phylogénétique basé sur le gène codant pour l'ARNr 16S montrant les relations des iACCMTB de morphotype 3 (sédiment) avec la seule autre bactérie magnétotactique environnementale décrite au sein de l'ordre CAIRSR01.** Arbre construit avec la méthode du maximum de vraisemblance. La racine est en gris. La longueur des branches représente le nombre de substitutions par site. Les cercles sur les nœuds internes représentent le support statistique considéré comme satisfaisant lorsque le taux de vraisemblance (aLRT) est supérieur à 0.95 (estimé de 1000 réplicas) et la valeur de bootstrap non paramétrique est supérieure à 80% (estimée de 500 réplicas). Les séquences des iACCMTB ont été déposées dans Genbank et les numéros d'accession correspondants sont donnés dans le nom des séquences.

L'arbre des iACCMTB du **morphotype 4** montre les relations de parenté entre les bactéries de la famille des *Chromatiaceae* suivant la classification GTDB (**Figure 91**). Cette classification présente plusieurs différences avec celle couramment validée par LPSN et présentée dans NCBI. L'ordre des *Chromatiales* dans NCBI est paraphylétique et regroupe certaines familles qui n'existent pas dans la classification GTDB. Le génome CCP4-SC76 forme un groupe monophylétique avec les espèces du genre *Achromatium* dont celle formant des iACC. Contrairement aux **iACCMTB** des autres morphotypes, CCP4-SC76 représente une feuille isolée et ne se regroupe pas avec d'autres SAGs ou MAGs environnementaux.

Les taux d'identité moyens des protéines et les placements de GTDB-tk soutiennent que les iACCMTB du **morphotype 4** appartiennent à un genre différent non décrit au sein de la famille des *Chromatiaceae,* dont elles sont les uniques représentantes dans les collections. En effet, le pourcentage d'identité moyen sur toutes les protéines (AAI) de CCP4-SC76 avec les génomes des espèces les plus proches incluant la *Chromatiaceae sp.* WMS2 et *Canditatus* Achromatium palustre Sipp_2015 est inférieur à 59%.

Dans un dernier arbre construit des séquences ADNr 16S, nous avons tenté d'inférer les relations entre les séquences d'*Achromatium spp.* et bactéries environnementales

proches pour lesquelles nous ne disposons d'aucun génome (**Figure 93**). Il montre que les séquences des cellules non magnétotactiques *Achromatium-like* du lac Pavin isolées dans le sédiment par Benzerara et al., (2021) sont génétiquement éloignées des iACCMTB du **morphotype 4**.

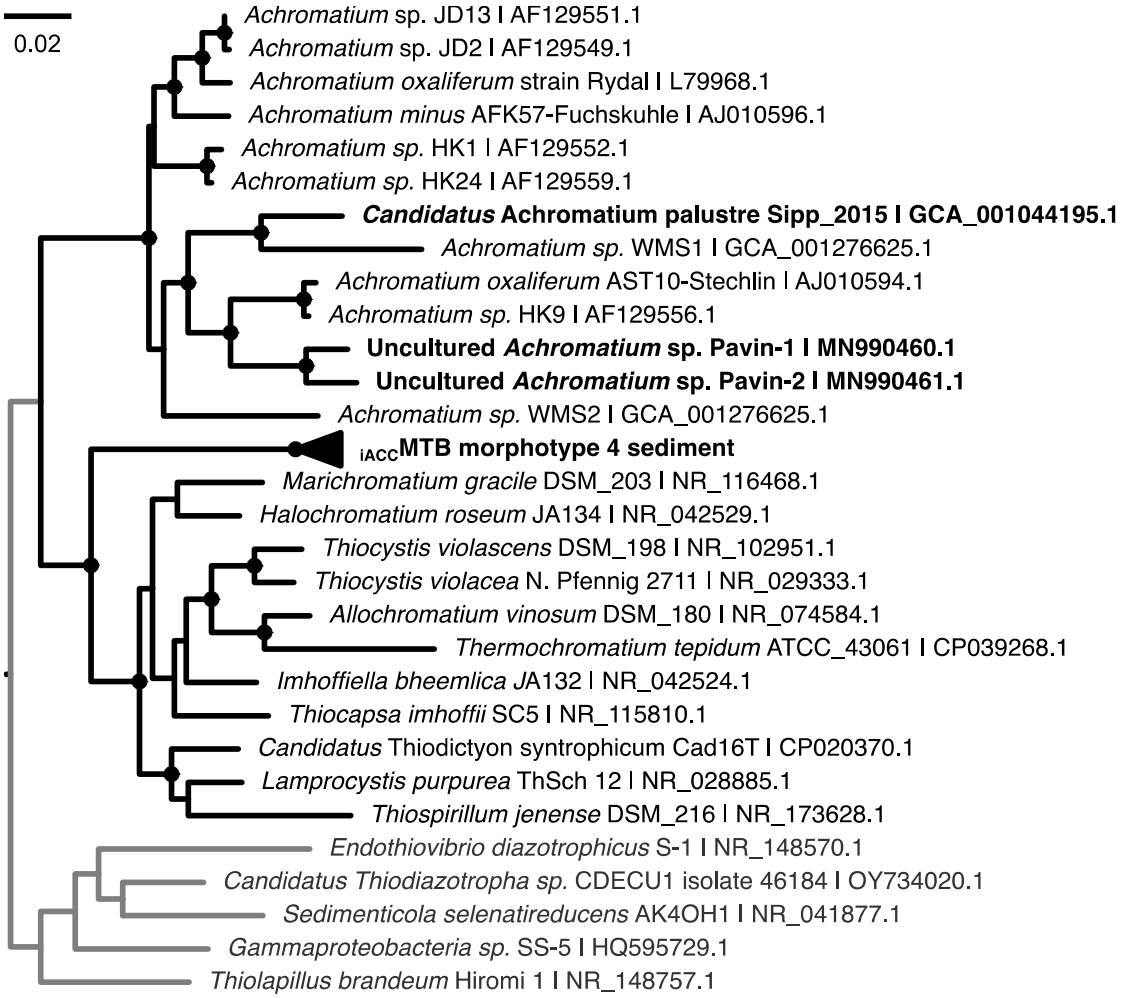


Figure 93 : **Arbre phylogénétique basé sur le gène codant pour l'ARNr 16S montrant les relations des iACCMTB de morphotype 4 (sédiment) avec les autres bactéries environnementales décrites au sein de la famille *Chromatiaceae*.** Arbre construit avec la méthode du maximum de vraisemblance. La racine est en gris. La longueur des branches représente le nombre de substitutions par site. Les cercles sur les nœuds internes représentent le support statistique considéré comme satisfaisant lorsque le taux de vraisemblance (aLRT) est supérieur à 0.95 (estimé de 1000 réplicas) et la valeur de bootstrap non paramétrique est supérieure à 80% (estimée de 500 réplicas). Les séquences des iACCMTB ont été déposées dans Genbank et les numéros d'accession correspondants sont donnés dans le nom des séquences.

6. Bases génomiques et fonctionnelles de la formation des biominéraux

Cette section a pour objectif d'étudier les bases génomiques et fonctionnelles en lien avec la formation de biominéraux (i.e. iACC et magnétosomes) chez les populations de $_{iACC}$MTB notamment par la reconstruction des voies métaboliques et par la recherche de gènes codant pour la magnétotaxie (i.e. MGC). Nous nous interrogeons sur l'origine moléculaire du carbone utilisé initialement et incorporé pour la formation des phases carbonatées intracellulaires. Grâce à des SAGs provenant de cellules représentatives des morphotypes de $_{iACC}$MTB, nous avons obtenu un jeu de génomes appartenant à la famille des *Azospirillaceae* de la classe des *Alphaproteobacteria* et appartenant à deux ordres de la classe des *Gammaproteobacteria* (*Chromatiales* et CAIRSR01). Les voies métaboliques putatives sont reconstruites *in silico* afin de pouvoir émettre des hypothèses sur les métabolismes de ces microorganismes. Des hypothèses seront proposées sur les mécanismes moléculaires associés à la formation des biominéraux de carbonate de Ca chez les MTB.

6.1. Annotation et synténie des clusters de gènes associés à la formation des magnétosomes

La formation des magnétosomes est codée par un ensemble de gènes regroupés sous la forme de clusters de gènes parfois organisés en un îlot et conservés chez toutes les MTB (cf. synthèse bibliographique). Certains de ces gènes sont obligatoires tandis que d'autres sont accessoires. Une annotation automatique a été réalisée par la plateforme MicroScope. Cette plateforme permet également de faire une annotation manuelle à travers une interface graphique *biologist friendly* qui propose de visualiser directement les synténies (i.e. la conservation de l'organisation des gènes sur des chromosomes de deux espèces différentes) avec d'autres génomes choisis par l'utilisateur. Cet outil est particulièrement utile pour trouver des gènes homologues ou des synténies de gènes, surtout lorsque les génomes sont éloignés. J'ai utilisé les génomes complets de référence des souches cultivées de *Magnetospirillum gryphiswaldense* et les *Gammaproteobacteria spp.* BW-2 et SS-5 pour rechercher des homologues de gènes de magnétosome chez les $_{iACC}$MTB.

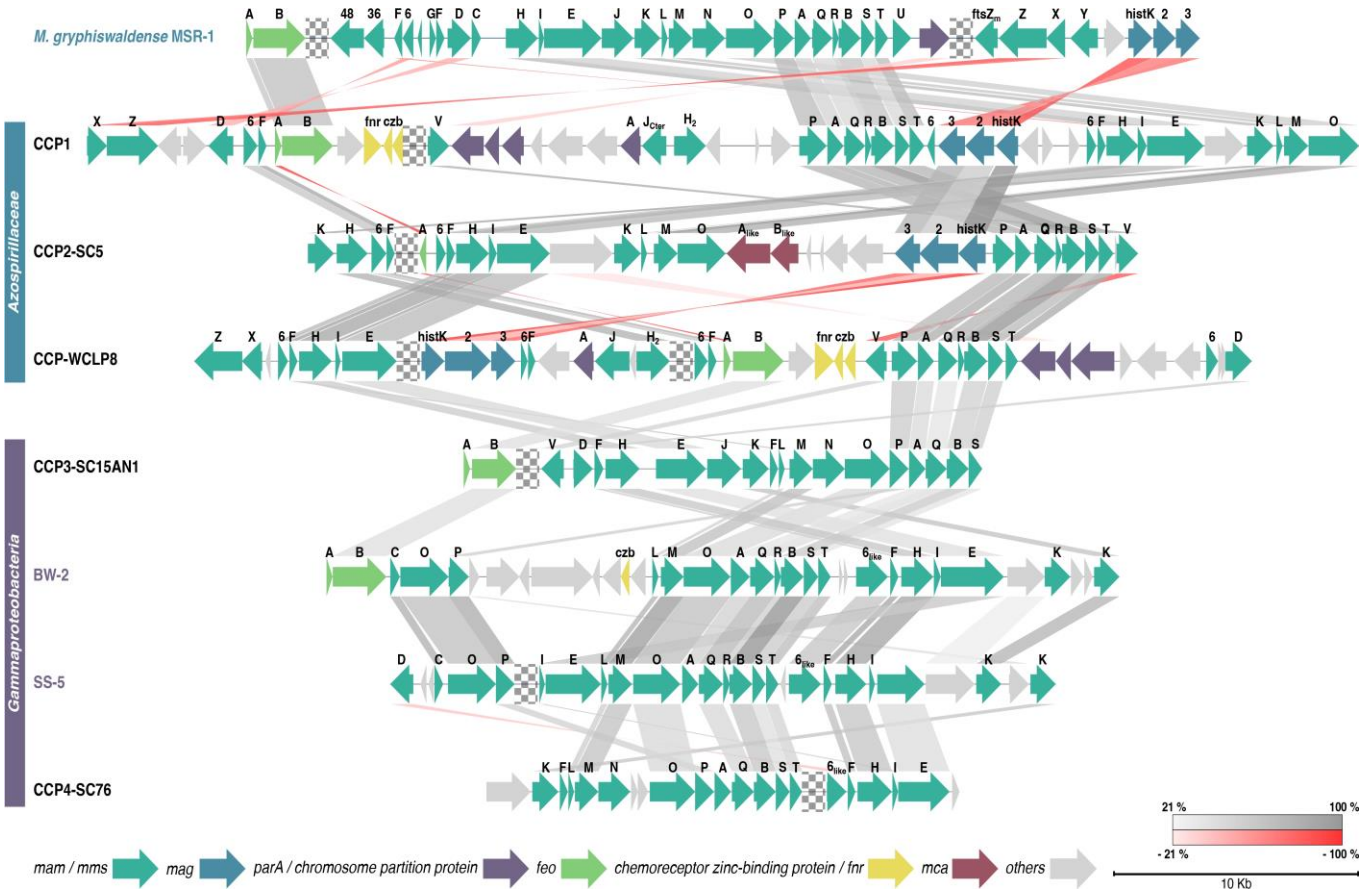


Figure 94 : **Conservation de la synténie du MGC chez les iACCMTB représentant les 5 morphotypes et chez les souches cultivées de *Pseudomonadota* magnétotactiques MSR-1, BW-2 et SS-5.** Les génomes ont été organisés par classe (*Alphaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria*). Chaque flèche représente un gène d'une couleur correspondant à un opéron spécifique chez MSR-1. Les gènes gris sont des gènes dont la fonction est inconnue ou qui ne sont pas conservés chez les MTB. Les damiers représentent des troncations essentiellement et parfois des régions espaçant deux opérons. Les identités de séquence entre gènes homologues ont été calculées avec MMseqs2 et sont représentées par des bandes dont l'intensité est corrélée avec le pourcentage d'identité. Certains homologues ne sont pas reliés car les séquences sont trop divergentes et / ou il existe des paralogues. Les familles d'homologues ont alors été déterminées par la présence de domaines conservés. Quatre génomes de iACCMTB sont montrés dans cette figure : CCP-1 est le nom donné au génome du morphotype 1 de iACCMTB ; CCP2-SC-5 au morphotype 2 ; CCP-WCLP8 au morphotype 5 de la colonne d'eau ; CCP3-SC15AN1 au morphotype 3 ; CCP4-SC76 au morphotype 4. Tous les MGCs de tes iACCMTB et des MAGs des mêmes groupes sont donnés dans la figure 98.

Malgré la faible couverture du génome du **morphotype 1** (CCP-1) (**Figure 94**), un cluster de gènes codant pour la magnétotaxie (MGC) avait été extrait du plus long contig (Monteil et al., 2021). Nous avons également assemblé un MGC quasiment complet pour tous les génomes séquencés dans cette étude. Des structures en opérons similaires à ceux identifiés chez MSR-1 ont été recherchées même si elles nécessiteraient d'être validées expérimentalement pour vraiment être définies comme opérons.

L'analyse des MGC des génomes représentatifs des *Azospirillaceae* magnétotactiques (morphotype 1, 2 et 5) montre la **présence des principaux opérons** (e.g. *mam, mms, feo*) caractérisés chez l'espèce de référence *Magnetospirillum gryphiswaldense* (MSR-1), mais dans des organisations variables (**Figure 94**). **La synténie n'est donc pas conservée entre espèces des deux familles et une structure opéronique spécifique aux iACCMTB semble exister.** En effet, le MGC des génomes CCP1, CCP2-SC5 et CCP5-WCLP8 des morphotypes 1, 2 et 5, contiennent des homologues de quasiment tous les gènes de l'opéron principal *mamAB* (composé de *mamH, I, E, J, K, L, M, N, O, P, A, Q, R, B, S, T, U*), à

l'exception du gène *mamN*, impliqué dans la croissance des cristaux en régulant le pH à l'intérieur du magnétosome) (Jogler and Schüler, 2007) (**Figure 94**). Si *mamJ,* impliqué dans l'organisation ultrastructurale de la chaîne du magnétosome (Scheffel and Schüler, 2007) semble absent dans CCP2-SC5, il est retrouvé chez CCP5-WCLP8 et uniquement son extrémité C-terminale ($mamJ_{Cter}$) a été détectée à côté d'une duplication de mamH pour CCP1. L'opéron *mamAB* était incomplet pour le génome du morphotype **5** (CCP5-WCLP8). En effet, les gènes *mamK, L, M* et *O* n'ont pas été trouvé, possiblement à cause de l'assemblage : le contig étant tronqué en extrémité 3' de *mamE*.

La synténie du MGC n'est donc pas totalement conservée dans l'opéron *mamAB*, et certains gènes sont absents comme *mamY* composant l'opéron de gènes accessoires *mamXYZ*. L'opéron *mamGFDC* de MSR-1 n'est pas présent dans les génomes d'*Azospirillaceae* magnétotactiques : seuls *mamD* et mamF ont été détectés dans différentes régions. La protéine MamC ne semble pas présente alors qu'elle est impliquée dans le contrôle de la taille des cristaux et qu'elle est la deuxième protéine la plus abondante dans les magnétosomes de MSR-1 (Nudelman et al., 2016) (**Figure 94**). L'opéron *feoABm,* impliqué dans le transport du fer pour la formation des magnétosomes chez MSR-1, était complet pour les génomes des morphotypes **1** et **5** et tronqué pour CCP2-SC5. Des homologues des gènes *mca* ($mcaA_{like}$, B_{like}) impliqués dans l'alignement et la disposition des magnétosomes (Wan et al., 2022b) ont été détectés seulement dans le génome du morphotype **2** (CCP2-SC5) (**Figure 94**).

Les MGCs des *Gammaproteobacteria* magnétotactiques sont en général beaucoup plus simples et plus petits. On y retrouve essentiellement l'opéron *mamAB* avec moins de gènes accessoires. Ici, l'analyse de la synténie du MGC dans les génomes représentatifs des $_{iACC}$MTB *Gammaproteobacteria*, comprend également l'analyse de deux génomes provenant de souches magnétotactiques cultivées et proches des morphotypes de $_{iACC}$MTB : BW-2 pour le morphotype 3 et SS-5 pour le morphotype 4, représentés par CCP3-SC15AN1 et CCP4-SC76 respectivement dont la description du MGC n'a jamais fait l'objet d'une publication.

La synténie de l'opéron *mamAB* est partiellement conservée au sein des *Pseudomonadota*, mais elle semble très conservée au sein des *Gammaproteobacteria* magnétotactiques. L'opéron *feoAB* est présent, mais les opérons *mamXY* et *mamGFDC* sont absents bien qu'on retrouve *mamC* et *mamF* au milieu d'autres opérons putatifs (**Figure 94**). BW-2 et SS-5 ont la particularité de suivre une organisation similaire concernant les opérons *mam* et *mms* (i.e. *mam L*, *M*, *O*, *A*, *Q*, *R*, *B*, *S*, *T* suivi de *mms6*, *F*). La présence de *mamJ* est discutable car les séquences sont extrêmement divergentes, mais nous pensons que ce gène est présent dans tous les génomes. Identifier des homologues de *mamJ* est difficile car la protéine codée par ce gène est constituée d'une multitude de petites répétitions de domaines acides dont le nombre est variable en fonction des MTB. Ce gène est généralement positionné en amont de *mamK* chez les

espèces du genre *Magnetospirillum*, ce qui semble être le cas ici aussi. On peut constater que l'opéron *mag* est détecté dans tous les génomes des *Alphaproteobacteria* et totalement absent dans les génomes des *Gammaproteobacteria*. Ces résultats suggèrent que cet opéron est spécifique aux MTB dans la classe des *Alphaproteobacteria* (**Figure 94**). **A noter qu'aucun gène conservé chez les iACCMTB et absent chez les souches modèles n'a été détecté dans ou à proximité du MGC**.

Précédemment, nous avons identifié un groupe de génomes proches des iACCMTB chez les *Azospirillaceae* et l'ordre CAIRSR01 dans lequel nous avons cherché un MGC. Jusqu'à 30 gènes ont été identifiés pour Umea3_bin-0647 et 16 gènes pour VK3_bin-0780 avec une grande similarité de séquence des gènes de magnétosomes décrits (**Figure 95**). De la même manière, les génomes proches génétiquement du morphotype 3 (KR_bin-4016 et KR_bin-193) ont jusqu'à 22 homologues de gènes *mam*. **La conservation de la synténie même incomplète sur certains génomes ainsi que leur origine suggèrent que ces MAGs appartiennent à des MTB qui pourraient former pour certaines des iACC**. Il est possible que ces MAGs appartiennent à des bactéries abondantes dans ces lacs d'eau douce de Finlande et de Suède du fait de leur détection malgré l'absence de concentration magnétique.

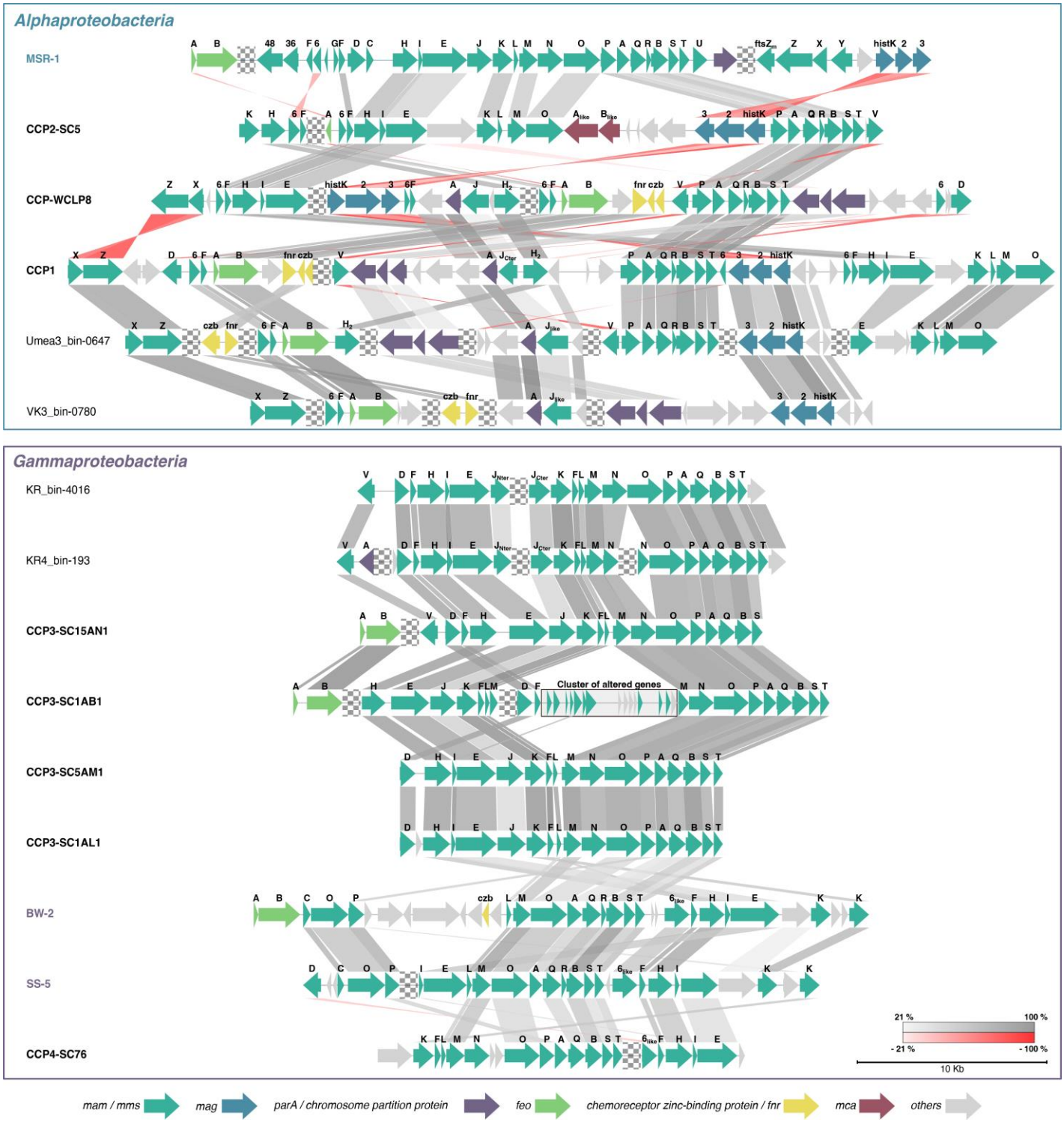


Figure 95 : **Conservation de la synténie du MGC des iACCMTB séquencés dans cette étude, des MAGs avec lesquels ils se regroupent dans les arbres phylogénétiques et des souches modèles de *Pseudomonadota* magnétotactiques MSR-1, BW-2 et SS-5.** Les génomes ont été organisés par classe (*Alphaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria*). Les noms en gras représentent les génomes des iACCMTB séquencés dans cette étude : CCP-1 est le nom donné au génome du morphotype 1 de iACCMTB ; CCP2-SC-5 au morphotype 2 ; CCP-WCLP8 au morphotype 5 de la colonne d'eau ; CCP3-SC1AL1, CCP3-SC5AM1, CCP3-SC1AB1, CCP3-SC15AN1 au morphotype 3 ; CCP4-SC76 au morphotype 4. Chaque flèche représente un gène d'une couleur correspondant à un opéron spécifique chez MSR-1. Les gènes gris sont des gènes dont la fonction est inconnue ou qui ne sont pas conservés chez les MTBs. Les damiers représentent des troncations essentiellement et parfois des régions espaçant deux opérons. Les identités de séquence entre homologues ont été calculées avec MMseqs2 et sont représentées par des bandes dont l'intensité est corrélée avec le pourcentage d'identité. Certains homologues ne sont pas reliés car les séquences sont trop divergentes et / ou il existe des paralogues. Les familles d'homologues ont alors été déterminées par la présence de domaines conservés.

6.2. Analyse du métabolisme et identification des types trophiques des iACCMTB

Nous avons voulu comprendre l'origine du carbone des iACC à travers la reconstruction des réseaux métaboliques. Suite à l'analyse fonctionnelle, nous avons regardé le métabolisme des iACCMTB à travers ces deux grandes bases de données MetaCyc et KEGG, qui contiennent de nombreuses voies présentes chez l'une qui ne sont pas retrouvées chez l'autre, même si beaucoup d'entre elles se chevauchent (Altman et al., 2013). Chaque voie de référence comprend plusieurs réactions catalysées par une ou plusieurs enzymes codées par des gènes. Pour chaque voie de référence MetaCyc et KEGG, on peut donc calculer un taux de complétude (0, aucun gène de la voie n'est présent ; 1, tous les gènes de la voie sont présents). Ces valeurs peuvent ensuite être comparées entre iACCMTB et la iACCB *Candidatus* Achromatium palustre Sipp_2015 (Salman et al., 2016) (**Tableaux S3a, S3b, Annexe 1**). Nous nous sommes focalisés sur les voies associées au métabolisme énergétique, et les voies d'assimilation, utilisation et de dégradation des sucres ou éléments en C1, dont les voies de fixation du CO_2.

Nous avons ensuite extrait les voies KEGG les plus intéressantes de ce tableau que nous avons complété avec des voies MetaCyc pertinentes pour notre étude et absentes dans la base de données KEGG. Cette matrice de taux de complétude nous a servi à construire une carte thermique (**Figure 96**) dans laquelle on retrouve les résultats pour tous les génomes à l'exception de CCP1 dont le taux de complétude du génome ne permettait pas une telle analyse.

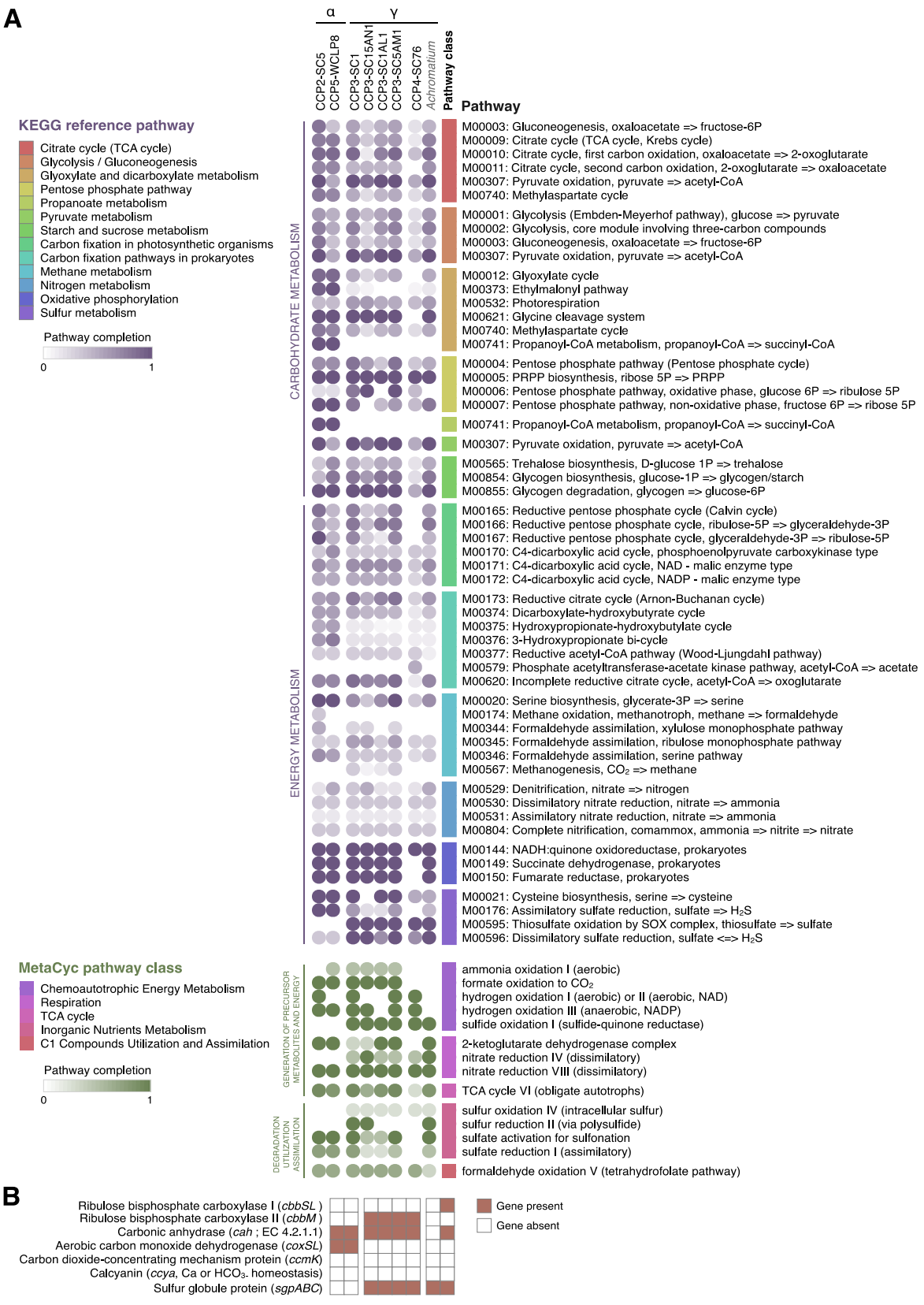


Figure 96 : **Cartes thermiques représentant certaines voies et gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, l'assimilation, l'utilisation ou la dégradation de composés organiques et inorganiques, et dans le cycle du calcium ou du soufre chez les iACCB.** (**A**) Carte thermique représentant les voies métaboliques de référence KEGG (violet) et MetaCyc (vert) analysées chez les génomes d'iACCB. Chaque voie de référence comprend plusieurs réactions catalysées par une ou plusieurs enzymes codées par des gènes. Pour chaque voie de référence MetaCyc et KEGG, on peut donc calculer un taux de complétude (0, aucun gène de la voie n'est présent ; 1, tous les gènes de la voie sont présents). Ce taux de complétude est obtenu en calculant le rapport du nombre de réactions enzymatiques pour la voie X dans un organisme donné sur le nombre total de réactions dans la même voie X. La nuance de couleur de chaque cercle représente le taux de complétude (entre 0 et 1). Le génome d'une iACCB (*Candidatus* Achromatium palustre Sipp_2015) (Salman et al., 2016) a également été ajouté dans notre analyse. Les génomes sont regroupés par classe de *Pseudomonadota*. (**B**) Recherche (présence / absence) de quelques gènes marqueurs fonctionnels dans les génomes d'iACCB. A noter que le génome de CCP4-SC76 est complet seulement à 60% expliquant des taux moins complets.

6.2.1. Sources d'énergie et accepteurs d'électrons

Toutes les iACCMTB semblent pouvoir respirer l'oxygène grâce à la présence d'oxydases classiques. **En anoxie, elles peuvent aussi respirer le nitrate par la voie de réduction incomplète** (voie VIII) dans laquelle le nitrate est d'abord réduit en nitrite, puis ce dernier converti en ammoniaque par une étape de réduction à six électrons, qui est sécrété par la cellule. Toutes les gammaprotéobactéries possèdent une nitrate réductase (quinone) (EC 1.7.5.1) dans leur génome. La présence de *nirS* (nitrite reductase (NO-forming)) dans un génome du morphotype 3 (CCP3-SC15AN1) suggère la réduction des nitrites en monoxyde d'azote par certaines espèces. L'opéron *nar* (*narC*, *G*, *I*, *J*, *H*, *Z*) codant pour la sous-unité bêta de la nitrate réductase a été détecté uniquement pour les morphotypes 2 et 5 d'alphaprotéobactéries. Le gène *nosZ* (codant pour l'enzyme terminale de la dénitrification, la N_2O réductase) (Horn et al., 2006) n'a été identifié que pour le morphotype 5 et le gène *norB* (codant pour la réduction du monoxyde d'azote) (Field et al., 2008) n'était présent que dans le génome d'*Achromatium*. Malgré la présence de ces gènes, **les iACCMTB ne semblent pas dénitrifiantes**.

Toutes pourraient **oxyder l'hydrogène** (à l'exception d'*Achromatium*) en aérobiose ou anaérobiose, mais pas l'ammonium, ce qui aurait été possible étant donné que plusieurs *Azospirillaceae* peuvent le faire. Il apparaît clairement que **toutes les gammaproteobactéries sont très probablement des sulfoxydantes**, en utilisant le thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) via le système SOX, et pourraient également oxyder le H_2S en sulfate par la sulfide-quinone réductase (voie d'oxydation du sulfide I). L'utilisation du soufre élémentaire n'est pas encore évidente, la voie d'oxydation du soufre *via* les polysulfides n'étant présente que chez *Achromatium* et certains génomes de CCP3.Le gène *aprA* (Adenylyl-sulfate reductase sous-unité alpha) a été également détecté dans les génomes des gammaprotéobactéries. L'adénosine 5′-phosphosulfate réductase (APR) est une enzyme clé des processus microbiens de réduction du sulfate et d'oxydation du soufre (Meyer and Kuever, 2007) permettant le contrôle du flux de soufre inorganique et probablement la production endogène de H_2S. Un gène codant pour une protéine requise à la formation des inclusions de soufre (SgpB) a été retrouvé dans tous les génomes des gammaprotéobactéries (i.e. morphotypes 3 et 4 et *Achromatium*) (**Figure 96B**). Cette enveloppe protéique a été décrite chez les bactéries pourpres sulfureuses et permettrait de contenir le soufre intracellulaire dans des globules (Prange et al., 2004), que nous avons aussi observés sous le microscope optique et plus rarement, lors d'une analyse STEM-HAADF-XEDS (**Figure S4**, **Annexe 1**). La sulfoxydation est donc un trait des *Gammaproteobacteria* qui les distingue fortement des iACCMTB des *Azospirillaceae* qui ne semblent pas pouvoir utiliser les composés soufrés réduits comme source d'électrons et n'ont que la voie de réduction assimilatrice de sulfate vers le H_2S (**Figure 96A**). *Achromatium* serait la seule iACCB à pouvoir fixer l'azote.

6.2.2. Métabolisme des carbohydrates

Toutes les iACCB *Alpha*- et *Gammaproteobacteria* peuvent utiliser des sources de carbone organique. Le morphotype 2 et 3 et *Achromatium* semblent capables de d'oxyder le pyruvate en acétyl-CoA (décarboxylation oxydative). Les alphaprotéobactéries (morphotype 2 et 5) auraient spécifiquement la voie d'éthylmalonyl-CoA et la voie d'oxydation du Propanoyl-CoA vers Succinyl-CoA appartenant au cycle du glyoxylate (voie métabolique dérivée du cycle de Krebs). Excepté le morphotype 4, toutes les iACCB seraient capables de (i) dégrader le glycogène en glucose 6-phosphate, (ii) d'utiliser le système de clivage de la glycine, également appelé complexe de la glycine décarboxylase, (iii) d'utiliser le fumarate (*via* la fumarate réductase), (iv) d'utiliser le succinate (*via* la succinate déshydrogénase) et l'acétate.

Le gène codant pour l'acétate perméase (*actP*) a été détecté pour le morphotype 4 et le morphotype 5, tandis que la glycogène synthase (*glgA*) a été détectée dans tous les génomes d'iACCB sauf celui du morphotype 4. Le gène *sdhA* (succinate déshydrogénase : aquinone + succinate <=> aquinol + fumarate) a été retrouvé dans tous les génomes sauf celui du morphotype 4 et d'*Achromatium*. **Ces recherches manuelles corroborent les inférences des voies métaboliques prédites suggérant que les populations d'iACCB pourraient utiliser des sources de carbone organique.**

6.2.3. Voies de fixation du carbone inorganique et utilisation des composés en C1

J'ai également effectué une recherche en parallèle de gènes marqueurs pouvant renseigner sur les bases moléculaires et fonctionnelles des iACC. Le carbone des carbonates pourrait soit provenir de la fixation du dioxyde de carbone, soit du carbone formé par la méthylotrophie ou méthanotrophie. Les gènes marqueurs fonctionnels utilisés dans le métabolisme du CH_4 et des composés carbonés en C1 ont été cherchés dans les génomes de iACCMTB et celui d'*Achromatium*. Par exemple, *mmoC* (méthane monooxygénase (MMO) composante C) a été détecté dans le génome du morphotype 2 uniquement, suggérant la possible utilisation du CH_4 par ce dernier. Toutefois, *mmoX* qui est également un marqueur de bactéries méthanotrophes (Tentori and Richardson, 2020) n'a pas été détecté pour le morphotype 2. Le marqueur génétique de bactérie méthylotrophe utilisant le méthanol, *mxaF* (methanol dehydrogenase gene) (Dumont, 2017), n'a pas été détecté dans les génomes. De plus le gène *pmoA*, codant pour la sous-unité bêta de la Methane oxygenase PmoA, cible commune pour les méthanotrophes, ainsi que le gène *fhcD*, liée à la méthanoptérine, intermédiaire réactionnel (Dumont, 2017) n'ont pas été détectés non plus. **Il est donc assez peu probable suivant les données, que le carbone des iACC vienne du CH_4.**

Toutes les iACCB *Gammaproteobacteria* pourraient fixer le CO_2 soit par le cycle rTCA ou par le cycle CBB. Tous les génomes du morphotype 3 possèdent le gène codant pour la

ribulose biphosphate carboxylase II (*cbbM*) alors que *Achromatium* possède la ribulose biphosphate carboxylase I (*cbbSL*) (**Figure 96B**). De manière similaire à *Achromatium*, les gammaproteobactéries magnétotactiques formant des iACC (i.e. morphotypes 3 et 4) semblent donc pouvoir assimiler le carbone organique (e.g. acétyl-CoA) ou fixer le carbone inorganique par des modes de vie mixotrophes ou lithoautotrophes facultatifs (Gray et al., 2000).

Selon les cartes KEGG, la voie réductrice de l'acétyl-coenzyme A I (bactéries homoacétogènes) aussi appelée de la voie W-L n'est pas complète chez l'ensemble des $_{iACC}$B, mais le module Pathologic prédit que la voie est fonctionnelle pour les *Alphaproteobacteria* et certaines $_{iACC}$MTB du morphotype 3. La voie de Wood-Ljungdahl permet à certains organismes d'utiliser l'hydrogène comme donneur d'électrons et le dioxyde de carbone comme un accepteur d'électrons tout en permettant de fabriquer de la matière organique. Cette voie réduit le CO_2 en monoxyde de carbone puis en formate. Les *Alphaproteobacteria* ont les gènes pour réaliser les deux réductions. En effet, seulement les alphaprotéobactéries (morphotype 2 et 5) possèdent *coxSL*, gènes codant pour l'enzyme monoxyde de carbone déshydrogénase (i.e. oxydation du monoxyde de carbone) (**Figure 96B**). Le formate peut être transformé en CO_2 également par la voie oxydative du formaldéhyde V (voie tétrahydrofolate) en conditions oxiques par toutes les bactéries. A l'exception des $_{iACC}$B de la famille des *Chromatiaceae*, toutes les $_{iACC}$B possèdent les gènes pour oxyder le formate en CO_2. On aurait donc un métabolisme versatile en conditions oxiques et en anoxie. A noter que nous avons rencontré deux difficultés pour les interprétations : (1) les faux négatifs dus aux problèmes de complétude des génomes (tout spécialement pour le génome CCP4-SC76) et (2) le manque de lien entre taux de complétude et prédiction de la voie, car parfois une partie seulement des gènes de la voie est suffisante pour assurer la voie. En d'autre termes : un taux de complétude différent de 1 ne veut pas dire que la bactérie ne peut pas réaliser la voie.

Notons enfin que les génomes CCP5-WCLP8 et Sipp_2025 codent pour une arséniate réductase à glutarédoxine (EC : 1.20.4.1) impliquée dans la détoxification à l'As(IV), tandis que deux génomes CCP3-SC5AM1 et CCP3-SC1AL1 codent pour le gène *arsB* qui permet l'extrusion de l'As(III).

6.2.4. Recherche de gènes fonctionnels associés avec la concentration/transport de métaux alcalinoterreux

Parallèlement, nous avons recherché dans la littérature s'il existait des gènes marqueurs fonctionnels potentiellement associés avec des mécanismes de concentration/transport de métaux alcalinoterreux. Les mécanismes de concentration du CO_2 dans les $_{iACC}$MTB semblent être indépendants de ceux associés aux carboxysomes car le gène *ccmK* n'a été détecté dans aucun génome (**Figure 96B**). Plusieurs anhydrases carboniques sont distribuées dans les génomes (dont celles codées par le gène *cah*). Ces enzymes

convertissent le CO_2 en acide carbonique (H_2CO_3) et peuvent être importante dans la précipitation extracellulaire de calcite d'origine microbienne. De telles enzymes pourraient être responsables de l'augmentation de la saturation dans les vacuoles des $_{iACC}$B induisant la formation des iACC comme cela a été suggéré pour *Achromatium* (Mansor et al., 2015). L'analyse des génomes des $_{iACC}$MTB et d'*Achromatium* en utilisant PCALF, un logiciel permettant de retrouver la protéine calcyanine et le gène *ccyA* de génomes (Benzerara et al., 2022), n'a rien donné. La formation de carbonates intracellulaires ne semble donc pas liée à la présence du gène *ccyA* chez les *Pseudomonadota* produisant des iACC. Cela suggère que *ccya* est un marqueur spécifique à l'embranchement des cyanobactéries (Benzerara et al., 2022).

Les protéines contenant des motifs de liaison au Ca ou des canaux Ca^{2+} pourraient potentiellement participer aux réactions de biominéralisation de carbonate de calcium, mais nous n'avons pas identifié de gènes de calcification putatifs par homologie dans les génomes. Nous avons uniquement trouvé une pompe à Calcium (*P-type Ca(2+) transporter*) chez *Candidatus* Achromatium palustre. Cependant, tout comme pour *Achromatium*, nous avons trouvé une pompe de type vacuolaire (V/A-type H+/Na+-transporting ATPase) dans tous les génomes de l'ordre CAIRSR01 mais pas dans les génomes d'*Azospirillaceae.* Plusieurs pyrophosphatases ont également été assemblées dans tous les génomes de $_{iACC}$MTB. Or, il a été suggéré que de telles enzymes seraient impliquées dans le transport du calcium, le pompage des protons et/ou la production d'énergie dans les membranes des inclusions contenant de la calcite (Mansor et al., 2015).

7. Résumé des résultats principaux

Durant ces travaux de thèse, nous avons caractérisé des populations de bactéries abondantes et diverses dans le lac Pavin formant des inclusions réfringentes au microscope optique. Nous avons d'abord mis au point un système de classification basé sur l'ultrastructure qui nous a servi à trier les différentes populations majoritaires dont nous avons identifié les groupes taxonomiques auxquelles elles sont affiliées et dont nous avons exploré les voies métaboliques pour comprendre la formation des carbonates. L'homogénéité des groupes génétiques derrière chaque morphotype soutient que la taille, le nombre et la forme des iACC sont contrôlés génétiquement tout comme c'est le cas pour les magnétosomes.

A la suite d'une caractérisation de ces groupes par une approche intégrative et pluridisciplinaire, nous avons identifié des genres, familles, ordres non décrits de bactéries magnétotactiques formant des carbonates de calcium au sein de deux classes de *Pseudomonadota*. Avec cette étude, nous augmentons les connaissances sur la distribution des $_{iACC}$B. En effet, en plus du genre *Achromatium*, des *Cyanobacteria*, et du premier genre de $_{iACC}$MTB décrit au sein des *Azospirillaceae*, nous avons identifié dans cette étude deux genres supplémentaires au sein des *Azospirillaceae*, plusieurs espèces au sein d'un ordre non décrit de la classe des *Gammaproteobacteria* (CAIRSR01) ainsi qu'un nouveau genre

de *Chromatiaceae* proche du genre *Achromatium* (**Figure 91**). Chacun de ces groupes génétiques et génomiques est associé à un morphotype et des caractéristiques minéralogiques. A l'exception de la structure et de la composition chimique des inclusions d'ACC et de la présence de magnétosomes, ces espèces de $_{iACC}$B ne semblent partager aucune élément d'ultrastructure commun.

Une annotation fonctionnelle sur des génomes partiels a permis de dessiner deux profils d'incorporation et d'utilisation du dioxyde de carbone au sein des *Pseudomonadota*. L'origine du carbone pourrait également être lié à l'utilisation du méthane, par syntrophie avec des méthanotrophes ou directement par la MTB elle-même. En effet, des marqueurs sont présents mais des voies restent incomplètes et des génomes plus complets restent à délivrer. On conclut ici que les voies de synthèse et de production d'énergie des $_{iACC}$B sont légèrement différentes entre les *Alphaproteobacteria* et les *Gammaproteobacteria*, mais sont similaires au sein de chaque classe (**Figure 97**). Les *Gammaproteobacteria* sont vraisemblablement des sulfoxydantes alors que les *Alphaproteobacteria* utiliseraient soit l'hydrogène soit les composés organiques comme source d'électrons. La formation d'iACC est donc, non seulement un trait polyphylétique au sein des bactéries (**Figure 97**), mais les données actuelles semblent soutenir plutôt des mécanismes et des types trophiques différents, dans lequel la calcyanine, indispensable à la formation des iACC chez les cyanobactéries, n'est pas nécessaire dans tous les taxa. Cela reflète une potentielle convergence évolutive de la formation des iACC chez les *Cyanobacteria* et les *Pseudomonadota*.

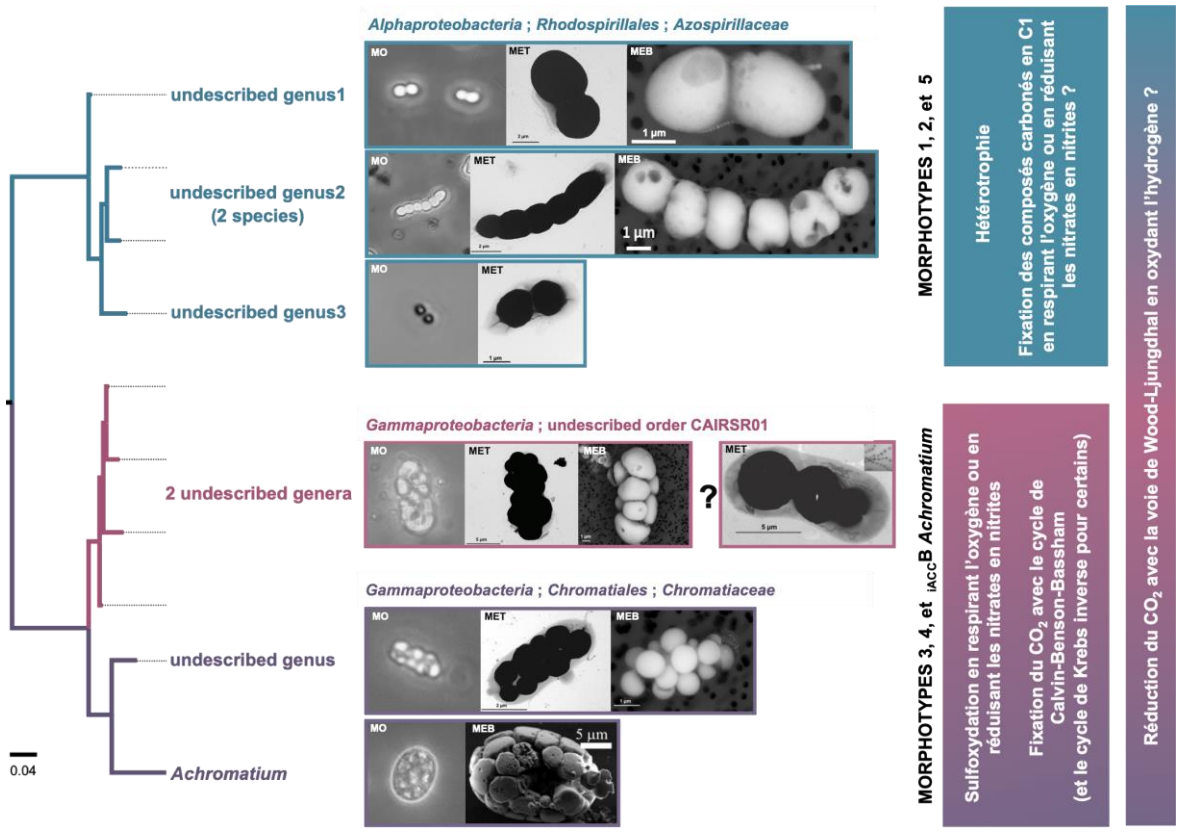


Figure 97 : Schéma représentant l'association des ultrastructures des $_{iACC}$B aux groupes taxonomiques. L'arbre représente un arbre des principaux OTUs des $_{iACC}$B. Seulement une espèce a été utilisée pour le genre *Achromatium* et celui associé au genre 1 (morphotype1) d'*Azospirillaceae*. Les images MO, MET et MEB, représentent des images de microscopie optique, microscopie électronique en transmission et microscopie à balayage, respectivement. Les couleurs représentent les groupes taxonomiques basés sur la classification GTDB.

Chapitre II : Découverte des *Thermodesulfobacteriota* magnétotactiques formant des carbonates de baryum

1. Contexte de la découverte

Les analyses de MET de MTB concentrées des sédiments du Lac Pavin nous ont permis de mettre en évidence une grande diversité de bactéries avec des inclusions de forme, de taille et de nature très variées. C'est en étudiant cette diversité que nous avons observé des MTB, jamais décrites auparavant, produisant **plusieurs inclusions d'une centaine de nanomètres très denses aux électrons et des magnétosomes en forme de balle de fusil**. Les premières analyses chimiques de plusieurs préparations suggérant que les inclusions pouvaient être des carbonates exclusivement composées de baryum, nous avons décidé de les caractériser par une approche intégrative de la même manière que les iACCMTB. En effet, si la présence de carbonate était validée, ces MTB pourraient nous aider à comprendre les mécanismes de sélection des AEM. D'autre part, la présence de magnétosomes en balle de fusil étant évocateur de MTB n'appartenant ni aux classes des *Alphaproteobacteria* ou des *Gammaproteobacteria*, nous avions peut-être découvert un autre taxon potentiellement avec un métabolisme encore jamais associé à la formation de carbonates.

Bien que ces bactéries en forme de bâtonnet soient facilement reconnaissables au MET, elles ressemblent beaucoup à d'autres MTB sous le MO. Leur caractérisation, notamment par les approches de *single-cell sorting*, a donc été plus compliquée que pour les iACCMTB. C'est pourquoi cette étude n'est qu'incomplète à l'issue de ma thèse. Je présente dans ce chapitre les caractérisations partielles de plusieurs populations de morphotypes différents et leur identité putative car elle nécessite encore d'entre authentifiée.

2. Ultrastructure des principales populations de iAXCMTB

2.1. Morphologie, nage et inclusions

Ce nouveau type de MTB a été observé occasionnellement dès les premières recherches menées au lac Pavin par l'équipe depuis 2015. Mais son étude avait été mise de côté car cette bactérie est peu abondante dans les sédiments du lac Pavin. J'ai réalisé beaucoup de grilles de MET pour l'étude des iACCMTB en 2021 qui m'ont permis d'observer leur présence dans plusieurs échantillons du sédiment du lac Pavin.

L'image de MET de la **figure 98** montrant une iACCMTB et une MTB produisant des inclusions riches en baryum permet de comparer facilement les ultrastructures et de comprendre que les inclusions et les autres composants cellulaires sont de formes et d'organisations complètement différentes dans les deux cellules (**Figure 98**). L'ultrastructure et la morphologie de la cellule de droite sont typiques du morphotype de

la famille des *Azospirillaceae*: on voit une cellule d'environ 4 µm avec deux grosses inclusions très denses aux électrons à chaque pôle et deux plus petites inclusions au centre. Dans la cellule de gauche, l'espace cytoplasmique est occupé par des vacuoles de nature inconnue entre lesquelles sont distribuées une trentaine de petites inclusions globulaires très denses aux électrons mesurant entre 50 et 100 nm de diamètre (**Figure 98**). Par ailleurs, les magnétosomes sont en forme de balle de fusil, alignés en une seule chaîne parallèle à l'axe antéro-postérieur.

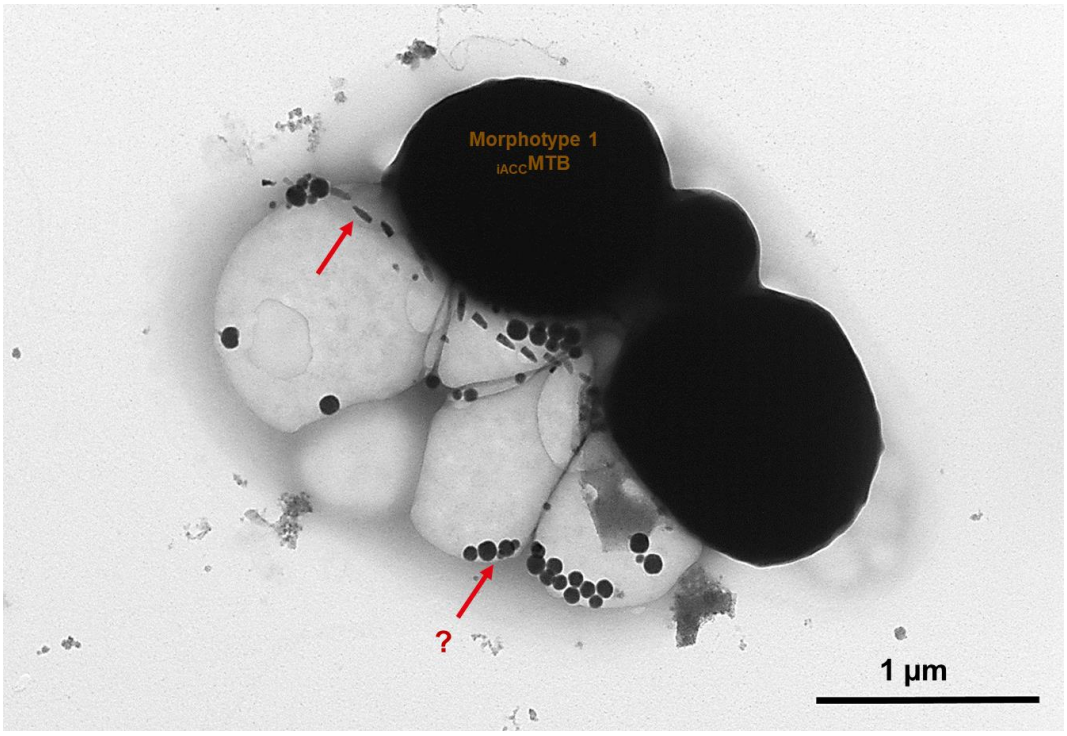


Figure 98 : Image de microscopie électronique en transmission (MET) montrant la cooccurrence d'une bactérie productrice des iACC de morphotype 1 (cellule de droite) avec un autre type de MTB produisant de petites inclusions globulaires et une chaine de magnétosomes en forme de balles de fusil (cellule de gauche).

Ce type de bactérie a été observé à plusieurs reprises dans les échantillons de sédiment, mais de façon aléatoire et en proportion faible par rapport à toutes les autres MTB. Cela n'a pas aidé à les caractériser sous le MO au milieu de toute la diversité de MTB. Ce morphotype de bâtonnet large produisant des magnétosomes en forme de balle de fusil est souvent associé à des taxa bactériens sulfatoréducteurs (e.g. *Desulfamplus magnetovallimortis* BW-1 (Descamps et al., 2017) et *Desulfovibrio magneticus* RS-1 (Sakaguchi et al., 2002)). J'ai donc fait l'hypothèse que ces bactéries étaient également des sulfatoréductrices et donc des anaérobes. Lors de la mission Mx65 de Mai 2021, j'ai conservé certains microcosmes de sédiment du lac Pavin dans le noir, en fermant les contenants de manière hermétique afin d'enrichir les populations de MTB anaérobes. Deux semaines après leur prélèvement, les observations au MO des populations magnétotactiques de ces microcosmes ont montré un enrichissement des MTB en forme de large bâtonnet possédant des petites inclusions réfringentes à la lumière du MO. Les analyses de MET de ces échantillons ont permis de confirmer que ces bactéries étaient

bien similaires à celle de la cellule de gauche de la **figure 98** nous permettant d'entreprendre une caractérisation approfondie de ces bactéries.

Lorsque nous avons compris à quoi elles ressemblaient sous le MO, nous avons été capables d'analyser leur nage et leur comportement magnétotactique qui sont très différents de ceux des iACCMTB. Ces bâtonnets ont une nage hélicoïdale et sont beaucoup plus sensibles à l'oxygène. En effet, ils ont tendance à faire des mouvements typiques de va-et-vient constants sur le bord de goutte exposé à l'air. De plus, ils ont la particularité de perdre leur motilité au bout de quelques minutes d'observation.

Parmi ces populations de bâtonnets, nous avons régulièrement observé des bactéries de taille et de morphologie diverses avec les mêmes petits granules globulaires réfringents. Nous les avons également micromanipulés, puis observés au MET pour découvrir **plusieurs populations avec le même type d'inclusions qui, comme les iACCMTB, pouvaient se classer sous différents morphotypes dont 6 étaient majoritaires** (**Figure 99**).

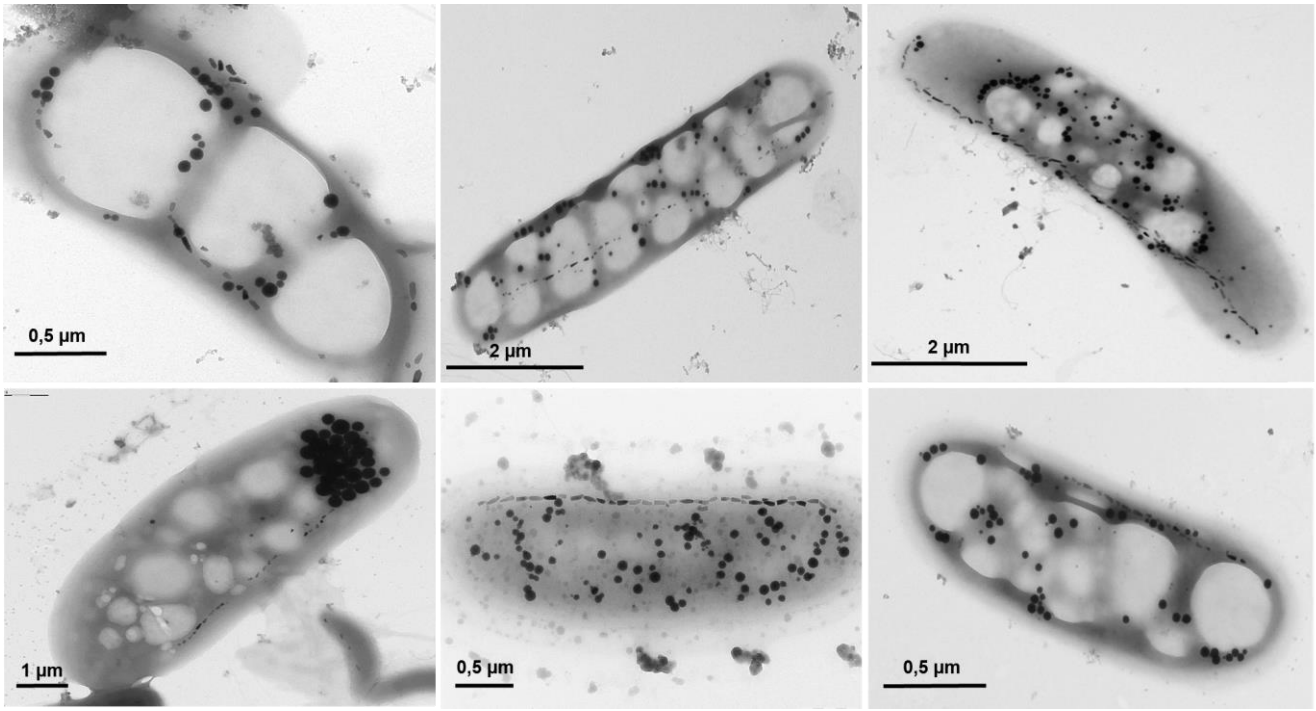


Figure 99 : **Images de MET montrant une partie de la diversité des MTB enrichies formant des petites inclusions globulaires réfringentes au MO et denses aux électrons au MET.** Chaque image représente un des 6 morphotypes de MTB les plus abondants. Tous les morphotypes se caractérisent par la présence d'une chaîne de magnétosomes en forme de balle de fusil, et la présence de vacuoles de taille variable pour 5 d'entre eux. La distinction de ces morphotypes est faite par la distribution des inclusions ainsi que la taille des cellules et leur forme.

Ces observations préliminaires nous permettent de constater des premières différences phénotypiques, telles que la taille et la forme de la cellule (i.e. bâtonnet allongé, cellule plus ovoïde) ainsi que l'ultrastructure cellulaire (e.g. présence de vacuoles ou non). La répartition des inclusions peut également être variable. Certaines MTB possèdent des inclusions localisées au niveau du pôle antérieur de la cellule tandis que

d'autres forment des inclusions distribuées de manière homogène dans l'espace cytoplasmique ou uniquement proches des vacuoles (**Figure 99**). Le nombre de magnétosomes formés ainsi que leur longueur varient également d'un morphotype à un autre, ce qui suggère qu'une diversité d'espèces se cache derrière cette diversité phénotypique. Les premières images montrent également une certaine homogénéité de la taille des inclusions, ce qui suggère un contrôle génétique. Nous sommes en attente d'images complémentaires afin de mesurer la variabilité des différents descripteurs cellulaires avec un nombre de réplicas suffisant pour chaque morphotype et définir une classification statistiquement robuste.

2.2. Chimie et morphologie des inclusions de carbonate et des magnétosomes

Nous avons voulu ensuite déterminer la nature de ces inclusions : sont-elles carbonatées ? Si oui, le minéral est-il amorphe ou cristallin ? À quels autres métaux de transition, alcalino-terreux ou autre espèces chimiques ces inclusions sont-elles associées ? Nous avons réalisé différentes analyses de microscopie et spectroscopie pour répondre à ces questions. Des analyses de STEM-HAADF-XEDS ont été réalisées en mars 2021 avec le Pr. Nicolas Menguy, à partir des trois morphotypes les plus différents. **Les analyses par XEDS nous ont montré la présence de Ba dans toutes les petites inclusions globulaires de chaque morphotype** (**Figure 100**). De manière surprenante, aucun autre AEM ou métal de transition n'a été détecté. Les analyses de diffraction électronique ont montré que ces minéraux étaient amorphes (**Figure 101**).

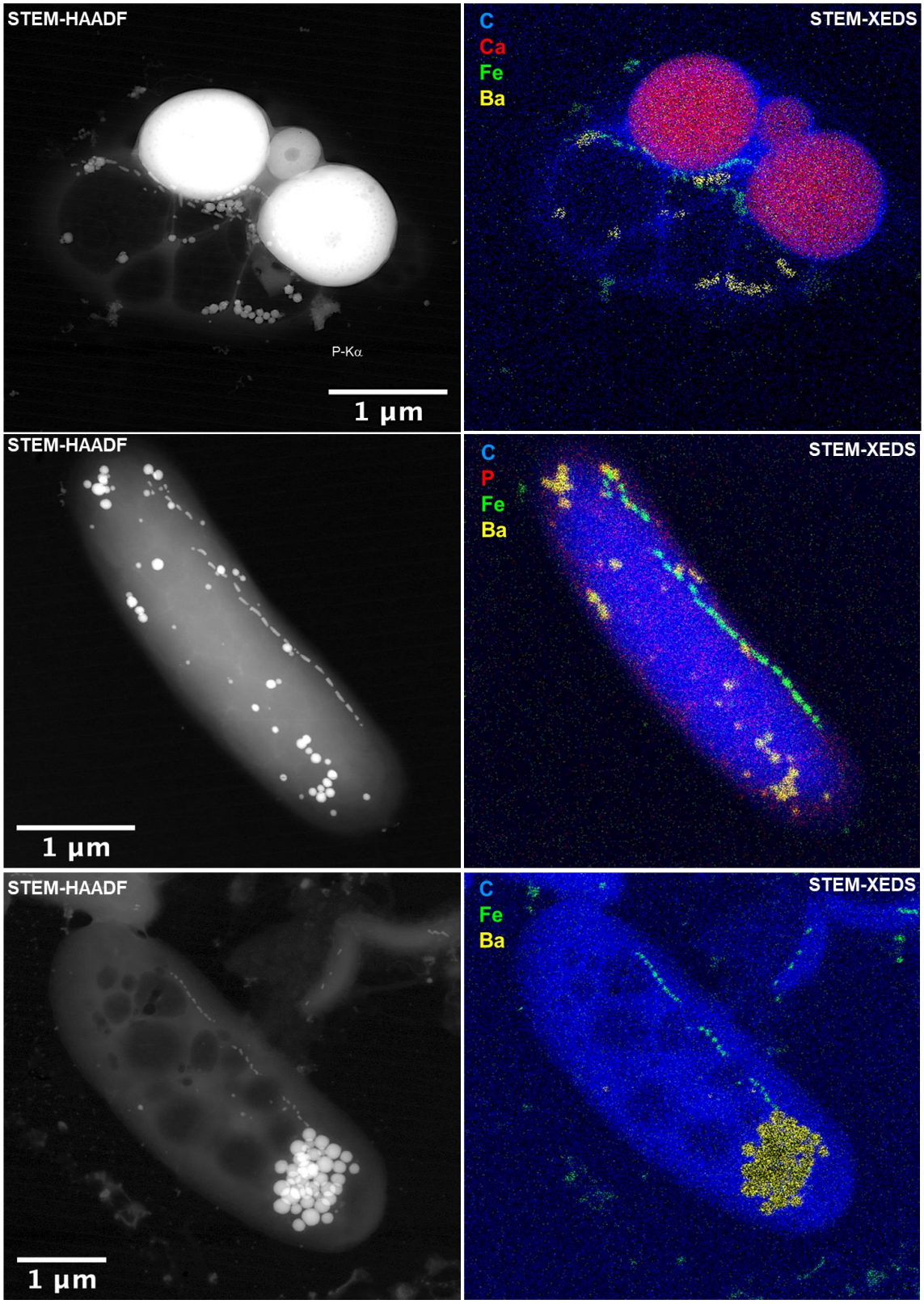


Figure 100 : **Analyses chimiques de 3 morphotypes de MTB produisant des petites inclusions denses aux électrons au MET dans les sédiments du lac Pavin. Images STEM-HAADF et STEM-XEDS et cartographies du carbone (C-K), calcium (Ca-K), fer (Fe-K) et baryum (Ba-K).** Les analyses STEM-XEDS indiquent que les inclusions de ces MTB sont riches en Ba.

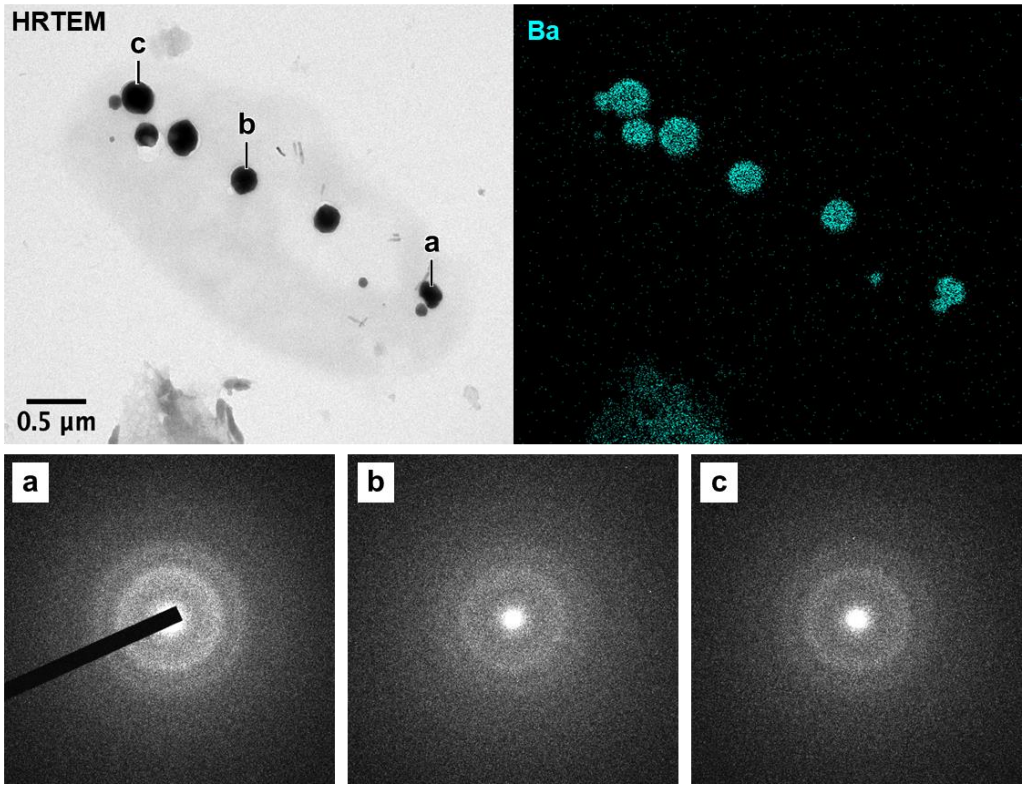


Figure 101 : **Analyse de diffraction électronique au HRTEM des petites inclusions denses aux électrons.** Les analyses de diffraction sur les inclusions (a, b et c) montrent que le minéral contenu dans ces inclusions est amorphe et composé majoritairement de baryum (Ba).

Nous avons rencontré des difficultés d'interprétation pour déterminer la composition chimique exacte de ces petites inclusions à partir des analyses STEM-XEDS. En effet, les spectres XEDS n'ont pas suffi à identifier la composition exacte, ceci pouvant être expliqué par : (i) la petite taille des inclusions associée à la perte d'énergie et de signal à cause du faisceau d'électron et (ii), l'élément Ba qui émet un trop gros signal et empêche d'observer la co-localisation avec le carbone. C'est pourquoi nous avons également utilisé la spectroscopie EELS pour vérifier la nature de ces inclusions (e.g. carbonates ou oxydes). Cette approche nous a permis de montrer que ces MTB formaient des inclusions de $BaCO_3$, avec le pic caractéristique du carbonate à 290,3 eV (**Figure 102**). Il est à noter que ce pic semble beaucoup moins intense que pour les ACC. Cela est peut-être dû (i) à la signature spectrale intrinsèque au $BaCO_3$ et (ii), à une dégradation de l'échantillon sous l'effet du faisceau. L'ensemble des résultats STEM-XEDS et EELS montre que **ce nouveau type d'inclusion correspond à des carbonates de baryum amorphes, i.e. « iABC » pour « intracellular *Amorphous Barium Carbonate* »**.

Le sédiment du lac Pavin abrite donc deux populations diverses de MTB formant deux types d'inclusions de carbonate amorphe, l'un associé au calcium (les $_{iACC}$MTB) et l'autre au baryum ($_{iABC}$MTB).

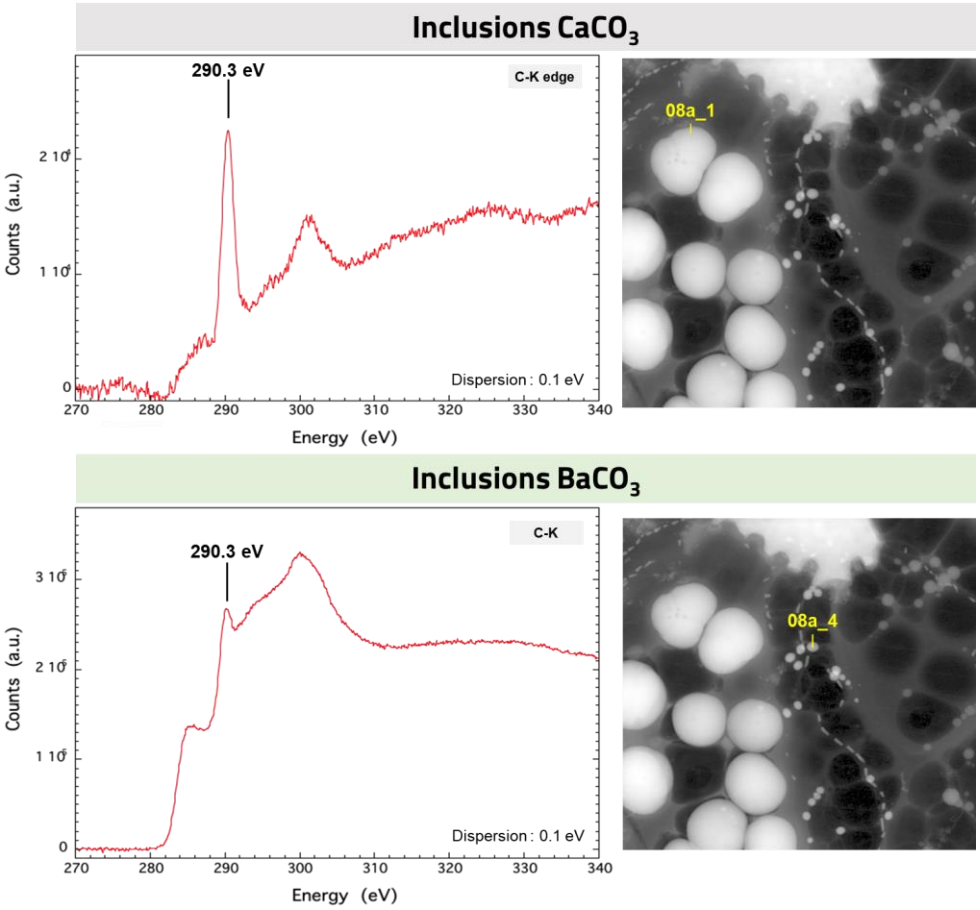


Figure 102 : **Spectres EELS d'une inclusion de $CaCO_3$ (08a_1) formée par une iACCMTB de morphotype 4 et des petites inclusions riches en Ba (08a_4) formées le nouveau type de MTB**. Ces spectres EELS obtenus dans les conditions de 0.1 eV / pixel, présentent le pic à 290.3 eV caractéristique d'un carbonate.

Le Dr. Daniel Chevrier, chercheur au BIAM, a étudié certaines propriétés physico-chimiques des iABC par des analyses de spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) au synchrotron (ligne de faisceau *Hard X-ray Nanoprobe*, *I14*, *Diamond Light Source,* décembre 2021). Ces analyses XAS ont été réalisées sur plusieurs minéraux de référence ($BaCO_3$, BaO, $BaPO_4$) et comparées à celles des iABC. Ces analyses ont non seulement confirmé la nature carbonatée et amorphe des iABC (**Figure 103**) mais indiquent également que ces inclusions sont principalement constituées de Ba. D'autres éléments et métaux ont également été détectés mais uniquement sous forme de traces. La meilleure correspondance a été obtenue pour l'Alstonite de formule $BaCa(CO_3)_2$. Ces résultats étaient surprenants car le Ca n'a pas été détecté dans les inclusions de ABC. Cela signifie que les iABC ont probablement une structure similaire à celle de l'aragonite ($CaCO_3$) mais riche en Ba et non en Ca. A noter que les analyses XAS des minéraux de référence les plus similaires sont souvent des formes hydratées, ce qui corrobore avec le caractère amorphe du minéral carbonaté mis en évidence avec les analyses précédentes.

Les analyse de HRTEM et de transformée de Fourier des magnétosomes ont montré que les magnétosomes en forme de balle de fusil sont composés de magnétite (Fe_3O_4) (**Figure 104**).

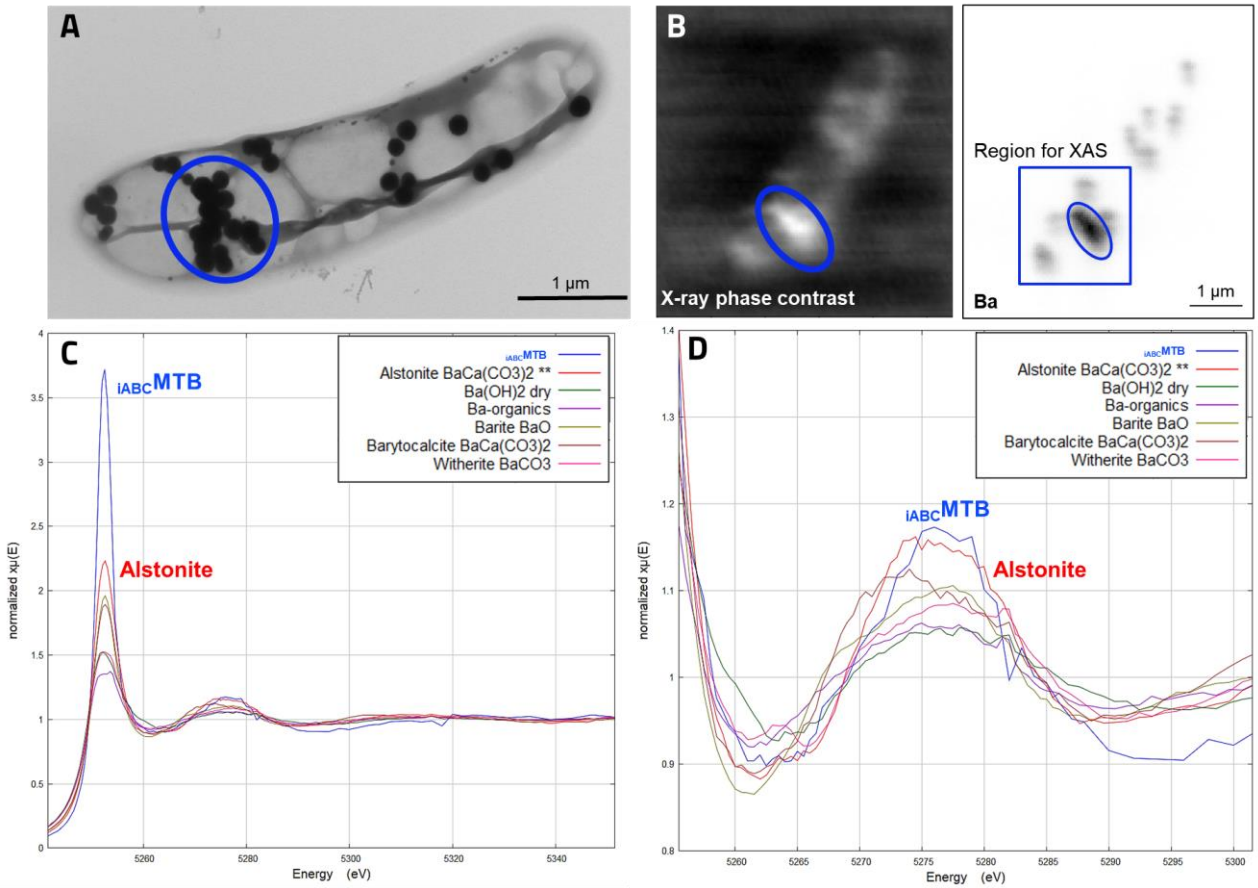


Figure 103 : **Analyse XAS des inclusions d'une iABCMTB.** A) Image de MET de la cellule de iABCMTB et des inclusions analysées (région sélectionnée en bleu). B) Analyse de contraste de phase aux rayons X collectés à 6,0 keV. Le signal détecté de l'élément Ba est très élevé (i.e. ~ 200 fois plus élevé que celui du Ca détecté à l'état de trace dans la même région). C) Spectre XAS des inclusions de la iABCMTB en comparaison avec des spectres de références. Une partie des spectres de référence a été obtenue grâce au Pr. Adrian Finch (University of St Andrews, UK). Ils ont été calibrés pour être comparés à nos données. D) Spectre XAS similaire, agrandissant l'étendue du signal associé au Ba pour une meilleure visualisation. Le spectre XAS des inclusions riches en Ba correspond le mieux au spectre de référence de l'Alstonite.

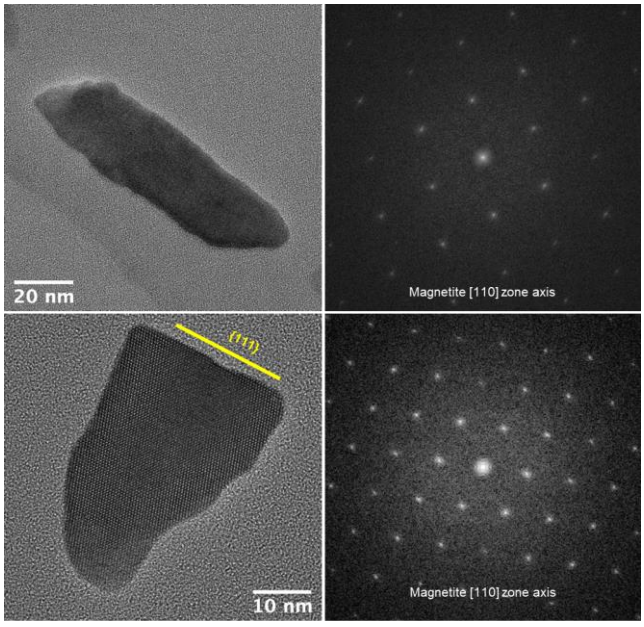


Figure 104 : **Analyse HRTEM et de transformée de Fourier des magnétosomes de iABCMTB, réalisée par le Pr. Nicolas Menguy à l'IMPMC, Paris.** La structure minéralogique confirme la signature de la magnétite (plan axial [110]).

2.3. Recherche d'une membrane entourant les minéraux

La présence d'une membrane protéique ou lipidique est un critère important lors de la caractérisation d'un organite. Nous avons effectué des coupes fines sur des échantillons enrichis en iABCMTB (**Figure 105**). **Une double membrane a été observée autour des iABC, très possiblement d'origine lipidique**. Cette membrane est similaire à celle observé pour le morphotype 1 (Monteil et al., 2021) et le morphotype 3 (**Figure 76**) mais elle semble être différente de celle observée chez les cyanobactéries (i.e. une monocouche d'origine protéique plus fine). Les coupes fines semblent donc soutenir la présence d'un organite intracellulaire dont le lumen est isolé du cytoplasme et qui reste à décrire. Les analyses suggèrent aussi des mécanismes moléculaires distincts entre les cyanobactéries et les iAXCMTB.

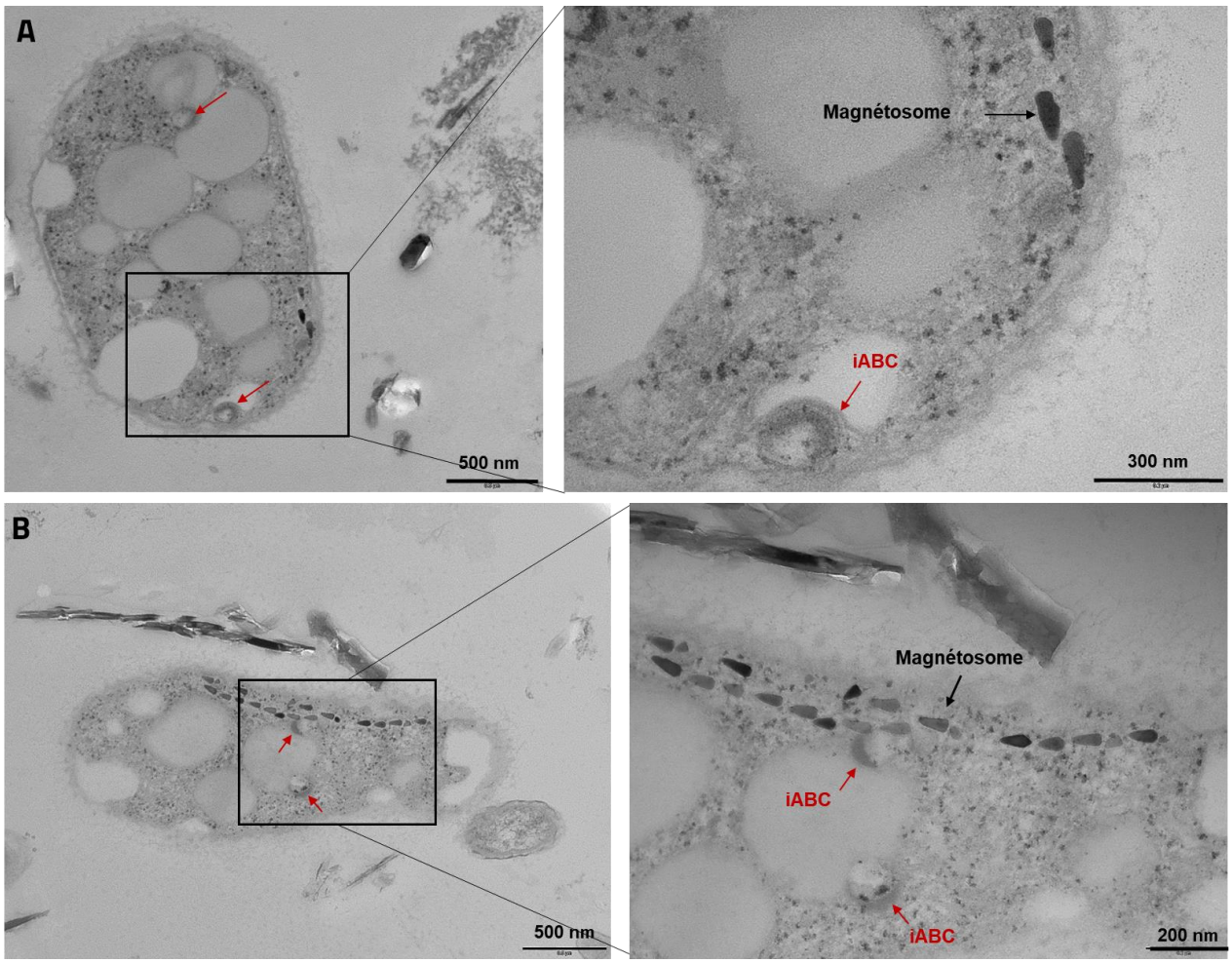


Figure 105 : **Coupes fines longitudinales de iABCMTB observées au MET**. A) et B) Images de MET de coupes longitudinales de deux iABCMTB formant (i) des granules d'iABC (indiqués par des flèches rouges) délimités par une membrane épaisse (i.e. bicouche lipidique) et (ii), des magnétosomes en forme de balle de fusil (indiqués par des flèches noires), délimités par une simple membrane issue de l'invagination de la membrane interne de la bactérie.

3. Abondance des iABCMTB dans les sédiments

La cooccurrence de populations de MTB formant des iACC ou des iABC dans les sédiments questionne sur les raisons des différentes populations de MTB à privilégier la formation de carbonate avec l'un ou l'autre des AEM. Nous avons cherché à mesurer les rapports relatifs de leurs abondances afin de comprendre leur impact sur les cycles géochimiques et inversement. Nous avons donc estimé l'abondance des populations de iABCMTB (**Figure 106**) dans les sédiments en parallèle de celle des iACCMTB (**Figure 69**, **73** du chapitre 1) dans les sites d'échantillonnage **LP1**, **LP2** et **LP3** lors de la mission **Mx70** (Juillet 2022). Les populations de iABCMTB ne représentaient pas plus que quelques centaines de cellules par mL de sédiment, soit maximum 5% des MTB formant des carbonates et 1/1000e voire 1/10000e des MTB totales. La prospection récente des sédiments des profondeurs du lac Pavin ou d'autres environnements lacustres, tel que le lac Aydat eutrophe et dimictique (i.e. subissant deux brassages de la colonne d'eau par an), a montré que ces abondances sont différentes dans d'autres lieux et conditions (cf. résultats présentés dans le **Chapitre III**). A noter que nous n'avons observé aucune iABCMTB dans la colonne d'eau du lac Pavin.

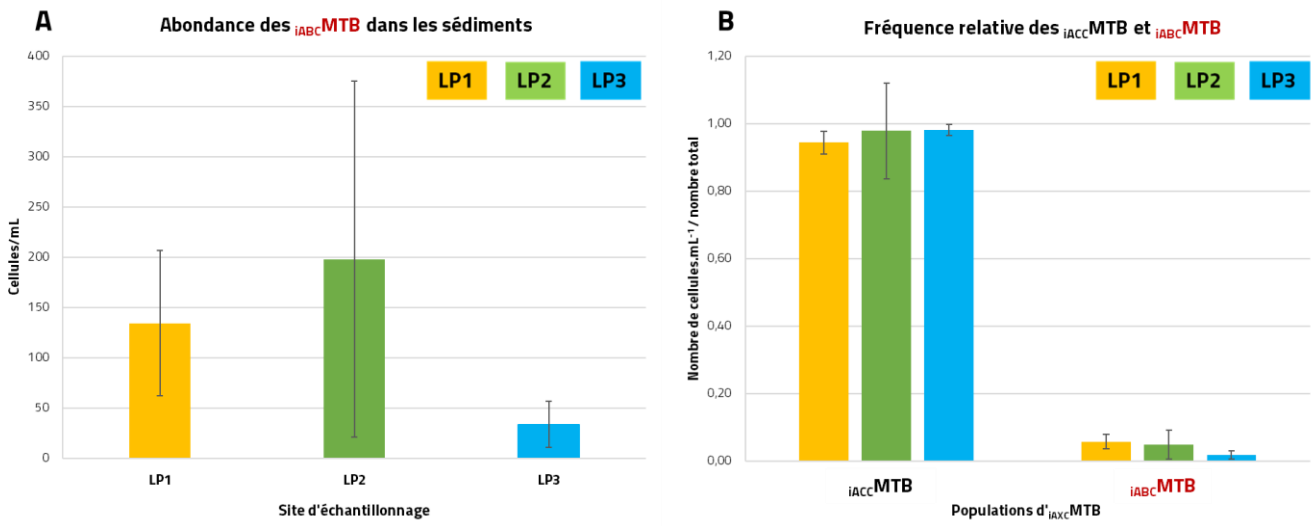


Figure 106 : **Concentrations des iABCMTB par mL de sédiment du bord du lac Pavin (A) et fréquences relatives des deux populations de iAXCMTB (B).** Les valeurs ont été obtenues pour chaque site échantillonné LP1, LP2 et LP3. Les comptages ont été effectués en triplicata lors de la campagne d'échantillonnage Mx70. Les écart-types ont été calculés pour chaque valeur. Les concentrations sont exprimées par mL de sédiment et sont une estimation basse puisqu'il faudrait exprimer ces concentrations par mL d'eau interstitielle.

4. Diversité génétique des iABCMTB

Les données précédentes ont montré une diversité phénotypique avec la présence d'au moins 6 morphotypes de iABCMTB dans les sédiments du lac Pavin (**Figure 99**). Nous avons commencé à analyser la diversité d'espèces représentées par ces morphotypes tout comme pour les iACCMTB. L'identité des iABCMTB a été déterminée par le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S amplifié à partir de cellules uniques triées sous le MO avec un micromanipulateur. A l'heure actuelle, 14 cellules ont été micromanipulées sur la base

de plusieurs critères : (1) leur morphologie (i.e. cellule en forme de bâtonnet avec de petites inclusions visibles et réfringentes sous le MO), (2) leur comportement magnétique (i.e. temps de nage très lent en direction de l'aimant ; comportement de répulsion face à l'O_2 au bord de goutte), (3) leur nage (i.e. nage hélicoïdale ; mouvement de va-et-vient très lent). Nous nous sommes également assurés que chaque cellule micromanipulée provenait de bouteilles de sédiments fortement enrichies en iABCMTB, dans lesquelles les cellules ont été préalablement observées au MET sur des grilles de microscopie électronique et au MO.

Sur les 14 cellules micromanipulées, 6 séquences d'ADNr 16S ont été obtenues. Tout comme pour les OTUs des iACCMTB, ces 6 séquences ont été comparées à celles de la collection de séquences « *Nucleotide Collection (Nr/Nt)* » de NCBI, en sélectionnant d'abord uniquement les séquences de souches type, et une seconde fois en incluant celles de toutes les séquences environnementales et/ou non cultivées. Les séquences ont été alignées avec BLASTN en utilisant les paramètres par défaut, pour trouver les séquences déposées dans NCBI les plus similaires.

Les alignements ont permis de révéler que les 6 cellules de iABCMTB appartenait à l'embranchement des *Thermodesulfobacteriota* (anciennement *Deltaproteobacteria*) (**Tableau 6**). Les séquences d'ADNr 16S ayant obtenu les meilleurs scores d'alignement et pourcentages d'identité avec les iABCMTB appartiendraient aux classes des *Desulfobacteria*, *Desulfobaccia* ou *Synthrophia*. Les premières données de séquençage suggèrent donc que les populations de iABCMTB pourraient former un groupe polyphylétique avec des représentants génétiquement très divergents entre eux et avec la diversité de *Thermodesulfobacteriota* décrite à ce jour. En effet, certaines iACCMTB pourraient former des nouveaux genres, voire des nouvelles familles et ordres au sein d'un embranchement constitué, en majorité, par des SRB. Ces résultats augmentent les connaissances sur la diversité des bactéries formant des carbonates d'alcalinoterreux (iAXCMTB) et nous amènent à nous interroger sur la raison de l'incorporation préférentielle du Ba dans les carbonates par ces bactéries, alors que toutes les autres MTB formant des carbonates incorporent du Ca. Dans l'hypothèse où les iABCMTB auraient des mécanismes d'assimilation spécifiquement dirigés vers le Ba, il serait intéressant de vérifier si le Ba est à l'état de traces dans le sédiment du lac Pavin et en concentration bien moins importante que le Ca (cf. résultats présentés dans le **Chapitre III**).

Cependant, il reste maintenant à réaliser l'authentification des séquences d'ADNr 16S par FISH pour les populations de iABCMTB de chaque morphotype dominant. Le séquençage de génomes de plusieurs de ces iABCMTB sera également bientôt entrepris au laboratoire.

Tableau 6 : **Séquences d'ADNr 16S de souches types dont les alignements obtenus suite à un BLAST avec les séquences de iABCMTB ont donné les meilleurs scores d'homologie et pourcentages d'identité.** Chaque séquence est associée à sa taxonomie actuelle dans NCBI (bien qu'elle puisse différer dans celle de GTDB) et son numéro d'accession.

Nom de la cellule de iABCMTB micromanipulée	Affiliation taxonomique	Exemples d'espèces cultivées les plus proches	Numéro d'accession GenBank	Identité (%)
SC_30	*Thermodesulfobacteriota; **Desulfobacteria** ; Desulfatiglandales; Desulfatiglandaceae; Desulfatiglans*	*Desulfatiglans anilini strain Ani1*	NR_025348.1	89.16 %
	*Thermodesulfobacteriota; **Desulfobaccia** ; Desulfobaccales; Desulfobaccaceae; Desulfobacca; Desulfobacca acetoxidans*	*Desulfobacca acetoxidans DSM 11109*	NR_074955.1	88.42%
SC_32	*Thermodesulfobacteriota; **Desulfobacteria** ; Desulfatiglandales; Desulfatiglandaceae; Desulfatiglans*	*Desulfatiglans anilini strain Ani1*	NR_025348.1	89.10 %
	*Thermodesulfobacteriota; **Desulfobaccia** ; Desulfobaccales; Desulfobaccaceae; Desulfobacca; Desulfobacca acetoxidans*	*Desulfobacca acetoxidans DSM 11109*	NR_074955.1	88.35%
SC_37	*Thermodesulfobacteriota; **Desulfobacteria** ; Desulfobacterales; Desulfococcaceae; Desulfonema; Desulfonema magnum*	*Desulfonema magnum str. Montpellier strain 4be13*	NR_025990.1	93.00 %
SC_38	*Thermodesulfobacteriota; **Desulfobacteria** ; Desulfobacterales; Desulfococcaceae; Desulfonema; Desulfonema magnum*	*Desulfonema magnum str. Montpellier strain 4be13*	NR_025990.1	92.22 %
SC_40	*Thermodesulfobacteriota; **Syntrophia** ; Syntrophales; Syntrophaceae; Syntrophus; Syntrophus aciditrophicus*	*Syntrophus aciditrophicus strain SB*	NR_102776.1	92.76%
SC_41	*Thermodesulfobacteriota; **Desulfobacteria** ; Desulfobacterales; Desulfococcaceae; Desulfonema; Desulfonema magnum*	*Desulfonema magnum str. Montpellier strain 4be13*	NR_025990.1	92.51 %

5. Observation d'autres *Thermodesulfobacteriota-like* formant des iACC dans les sédiments du lac Pavin

Lors des observations de MO et MET dédiées aux analyses des *Thermodesulfobacteriota* magnétotactiques formant des $BaCO_3$ dans les sédiments du lac Pavin, nous avons remarqué la présence d'une MTB de morphologie plus ovoïde, formant des magnétosomes en forme de balle de fusil arrangés en une ou deux chaînes, et des inclusions globulaires ressemblant aux iABC (**Figure 107A**). Bien que la taille des inclusions soit similaire à celles des iABC retrouvées chez les *Thermodesulfobacteriota*, leur contraste sous le MET était moins élevé. Une densité aux électrons moins importante étant souvent une indication que l'inclusion contient des élément moins lourds (e.g. Ca, P).

Les analyses de STEM-XEDS ont mis en évidence la présence de calcium dans les petites inclusions et non du baryum (**Figure 107B**). Cette découverte est particulièrement intéressante car la forme des magnétosomes en forme de balle de fusil suggère que ces bactéries appartiennent au phylum des *Thermodesulfobacteriota* et nous pouvons émettre l'hypothèse que des bactéries sulfatoréductrices magnétotactiques peuvent aussi

former des carbonates de calcium. Par ailleurs, l'observation de ce type de bactéries dans les mêmes échantillons que ceux dans lesquels sont retrouvées les $_{iABC}$MTB montre qu'il existe une sélectivité vis à vis de l'incorporation des AEM dans les inclusions.

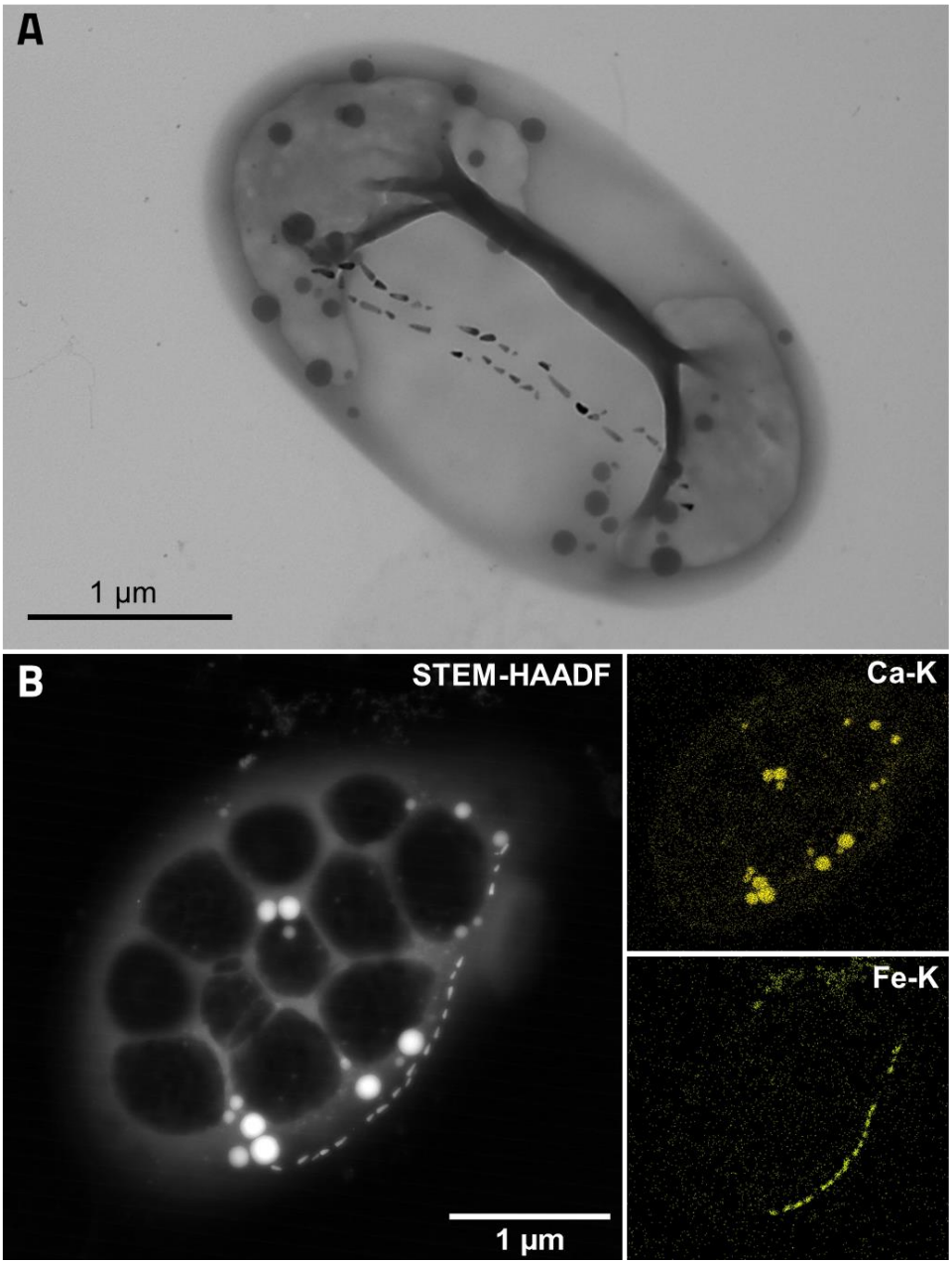


Figure 107 : **Analyse de l'ultrastructure d'un nouveau morphotype de MTB ovoïde.** (A). Image de MET montrant des nano-inclusions denses aux électrons et deux chaines de magnétosomes en forme de balle de fusil. (B) Cartographie chimique de ce nouveau type de MTB (Images de STEM-HAADF couplées au STEM-XEDS) montrant que les inclusions sont enrichies en Ca (Ca-K). Les cartographies de l'oxygène (O-K) et du carbone (C-K) ne sont pas présentées ici, mais sont co-localisés avec le Ca (Ca-K) suggérant que ces inclusions sont des iACC. La chaine de magnétosomes est représentée en vert par l'élément fer (Fe-K).

6. Résumé des résultats principaux

Nous avions montré dans le premier chapitre des Résultats que la carbonatogenèse intracellulaire était une fonction répandue chez les *Pseudomonadota* magnétotactiques, uniquement en ciblant notre étude sur l'échantillonnage des sédiments et de la colonne d'eau du lac Pavin. Dans ce deuxième chapitre, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il existe également plusieurs groupes de bactéries, composés majoritairement de SRB, capables de former des carbonates d'alcalino-terreux de composition différente. En effet, bien que la caractérisation de ces bactéries ne soit pas complète à l'issue de cette thèse, nous avons montré que d'autres MTB formaient d'autres types d'inclusions de carbonate enrichies en baryum mais également en calcium. Ces observations nous amènent à nous interroger sur les processus de séquestration des AEM incorporés dans les carbonates de ces bactéries car nous les avons trouvés dans les mêmes environnements, mais partagent-elles vraiment les mêmes niches ? Le carbone des carbonates a-t 'il la même origine ? Dans le **Chapitre III**, je présente les études géochimiques faites par notre consortium de recherche sur les différentes niches des $_{iAXC}$MTB qui permettront également de discuter ces points. Nous verrons dans la discussion générale de ce manuscrit comment ces résultats nous aident à comprendre (i) les mécanismes moléculaires et les voies métaboliques associés à la formation des iAXC et (ii), la contribution des $_{iAXC}$MTB dans les cycles géochimiques du C inorganique et des AEM. Les populations de $_{iAXC}$MTB représentent une diversité largement sous-estimée et peuvent offrir de nouveaux modèles de carbonatogenèse intracellulaire bactérienne.

Chapitre III : Étude de la niche écologique des bactéries magnétotactiques formant des carbonates intracellulaires

1. Introduction

Les iACCMTB et iABCMTB (iAXCMTB) sont non seulement abondantes dans le lac Pavin mais elles y sont aussi diverses. Il est étonnant que ces microorganismes n'aient pas été trouvés ailleurs et plus souvent, malgré un effort d'échantillonnage important mené depuis plus de 40 ans. Est-ce que le lac Pavin représente un écosystème spécifique favorable à leur développement ? D'autre part, nous n'avons observé qu'une seule espèce de iACCMTB dans la colonne d'eau et aucune iABCMTB. Les gradients chimiques de ces deux compartiments sont-ils les mêmes ? Les profils de distribution de la diversité des iAXCMTB au lac Pavin suggèrent qu'il existe une ou des niches écologiques spécifiques associée(s) à la carbonatogenèse intracellulaire et que la présence des iAXCMTB ou leur faculté (obligatoire ou facultative) à faire des phases carbonatées est dépendante de certains facteurs géochimiques et/ou biologiques.

L'objectif de ce **chapitre III** est d'identifier une partie de ces facteurs à travers trois études qui n'ont pas encoré été achevées. Nous avons d'abord analysé la structure des populations des iACCMTB en relation avec un certain nombre de paramètres (Bidaud et al., 2022). En parallèle, nous avons développé une approche similaire dans les sédiments du bord et les sédiments profonds en réalisant des carottages. J'ai contribué à ces deux études au niveau de l'échantillonnage, les comptages de MTB et certaines analyses de microscopie. Les analyses géochimiques et microbiennes sont encore en cours pour certains échantillons. Je présente donc uniquement quelques résultats. Enfin, nous avons prospecté d'autres milieux aquatiques afin de mesurer l'ubiquité de ces populations et d'identifier les points de divergence corrélés à leur présence/absence, ces résultats sont présentés dans une troisième partie de ce chapitre.

2. Niche biogéochimique associée à la présence des iACCMTB dans la colonne d'eau du lac Pavin

Les populations de MTB de la colonne d'eau du lac Pavin sont suivies depuis de nombreuses années. Depuis 2019, une analyse plus fine de ces bactéries et de leur niche(s) biogéochimique(s) est réalisée régulièrement afin d'en évaluer les variations saisonnières et de rechercher les variables géochimiques et biologiques à l'origine de leur distribution. Cette analyse consiste à (i) quantifier les MTB et les classer par morphotype tous les 20 cm le long d'un *transect* couvrant toute l'OATZ et (ii), mesurer plusieurs variables physico-chimiques *in situ* (cf. section méthodologies) ou en laboratoire après des traitements spécifiques. Les MTB et leur environnement géochimique dans la colonne d'eau ont été analysés 4 fois durant ma thèse entre juillet 2021 (Mx66) et juillet 2022 (Mx70). Les analyses physico-chimiques n'ont pas été terminées et rassemblées pour toutes les missions. Elles ne seront donc pas toutes montrées dans ce manuscrit. Cependant, nous avons toutes les données d'abondance des MTB sur les 4 missions et un jeu de données complet pour la mission Mx66 qui permettent ensemble d'apporter quelques nouvelles perspectives sur la niche écologique des iACCMTB.

Pour rappel, la structure des populations de MTB en octobre 2019 montrait que les populations étaient localisées en dessous de l'OATZ sur 2 m de profondeur autour de deux pics d'abondance : (i) le plus grand pic était constitué par des cocci magnétotactiques (MTBc) représentant plus de 95% des MTB totales et (ii) un petit pic, 40 cm plus profond, représenté pour la quasi-totalité par des iACCMTB (i.e. *Azospirillaceae* sp. de morphotype 5). Les auteurs avaient conclu qu'il existait une niche biogéochimique spécifique aux MTBc formant des polyphosphates. Cependant, aucun paramètre physico-chimique n'avait été rigoureusement corrélé à la présence de iACCMTB malgré un signal fort pour la concentration en calcium particulaire (Bidaud et al., 2022). Nous avons réfléchi à d'autres facteurs pouvant être structurants pour, et structurés par, les iACCMTB qui n'auraient pas été mesurés auparavant. Les concentrations en méthane et sulfure d'hydrogène nous ont parues intéressantes vis à vis du potentiel des iACCMTB à oxyder les composés soufrés réduits ou à utiliser les dérivés de la méthanotrophie.

Bien que nous ayons retrouvé la même diversité de MTB observée par Bidaud *et al*. (Bidaud et al., 2022) en octobre 2019, nous n'avons pas obtenu les mêmes distributions en juillet 2021. En effet, comme nous avons vu dans le Chapitre 1 (**Figure 70**), le pic d'abondance des iACCMTB était co-localisé avec celui des cocci magnétotactiques (MTBc). Ces distributions semblent saisonnières puisque nous avons observé à nouveau (i) le même double pic en octobre 2021 (**Figure 70B**) et (ii), une co-localisation des deux maximum d'abondance en juillet 2022 (**Figure 108**). Nous avons conclu que les MTBc et les iACCMTB ne partagent pas exactement la même niche écologique, mais que les conditions environnementales optimales pour leur croissance sont co-localisées à la même profondeur en été.

Nous avons observé à nouveau la même distribution globale de plusieurs variables géochimiques par rapport aux MTB (**Figure 109**). Tous comme les MTBc, les iACCMTB se situent juste en dessous de l'OATZ, mais à une profondeur à laquelle le potentiel redox (ORP) reste le plus fort et la concentration en H_2S nulle. Le maximum d'abondance des iACCMTB se situe à la profondeur (i.e. 56 m) à laquelle le méthane commence à apparaître pour ensuite augmenter exponentiellement jusqu'à atteindre une concentration de ~800 µmol/L à la limite de détection des MTB. Les nitrates (NO_3^-) ont complètement disparu et la concentration en sulfate (SO_4^{2-}) commence à diminuer à la profondeur où se trouve le maximum d'abondance des iACCMTB (i.e. respectivement à 56 m et à 55.2 m) (**Figure 109B**). Ces résultats corroborent avec ceux d'octobre 2019 et juillet 2022 également (**Figure 108**).

Il est à noter que la distribution des abondances des MTB en avril 2022 était très différente de celles des autres missions (**Figure 110**). En effet, au lieu d'observer un pic avec une concentration très forte localisée sur quelques centimètres, nous avons observé une concentration faible et homogène de MTB sur plusieurs mètres de profondeur en dessous de l'OATZ, dont **aucune n'était une iACCMTB** (**Figure 110**). Nous avons réalisé que la profondeur de l'OATZ fluctuait d'un jour à l'autre et que les gradients chimiques mesurés *in situ* étaient très variables (**Figure 110**). Nous avons attribué cette fluctuation au brassage des eaux induit par une très forte tempête quelques jours avant (i.e. tempête Diego, 08/04/2022). Il est intéressant de noter la sensibilité des iACCMTB à une telle perturbation des gradients. Ce travail est encore en cours et d'autres variables telles que la pCO2 doivent être estimées. Les perspectives de ce travail sont discutées à la fin dans la discussion générale.

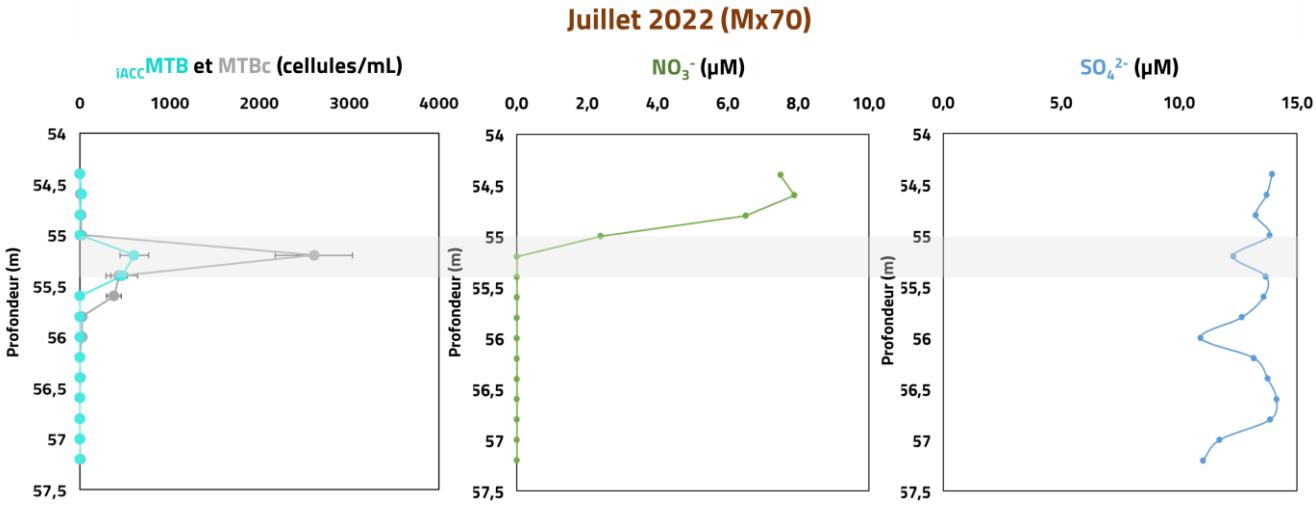
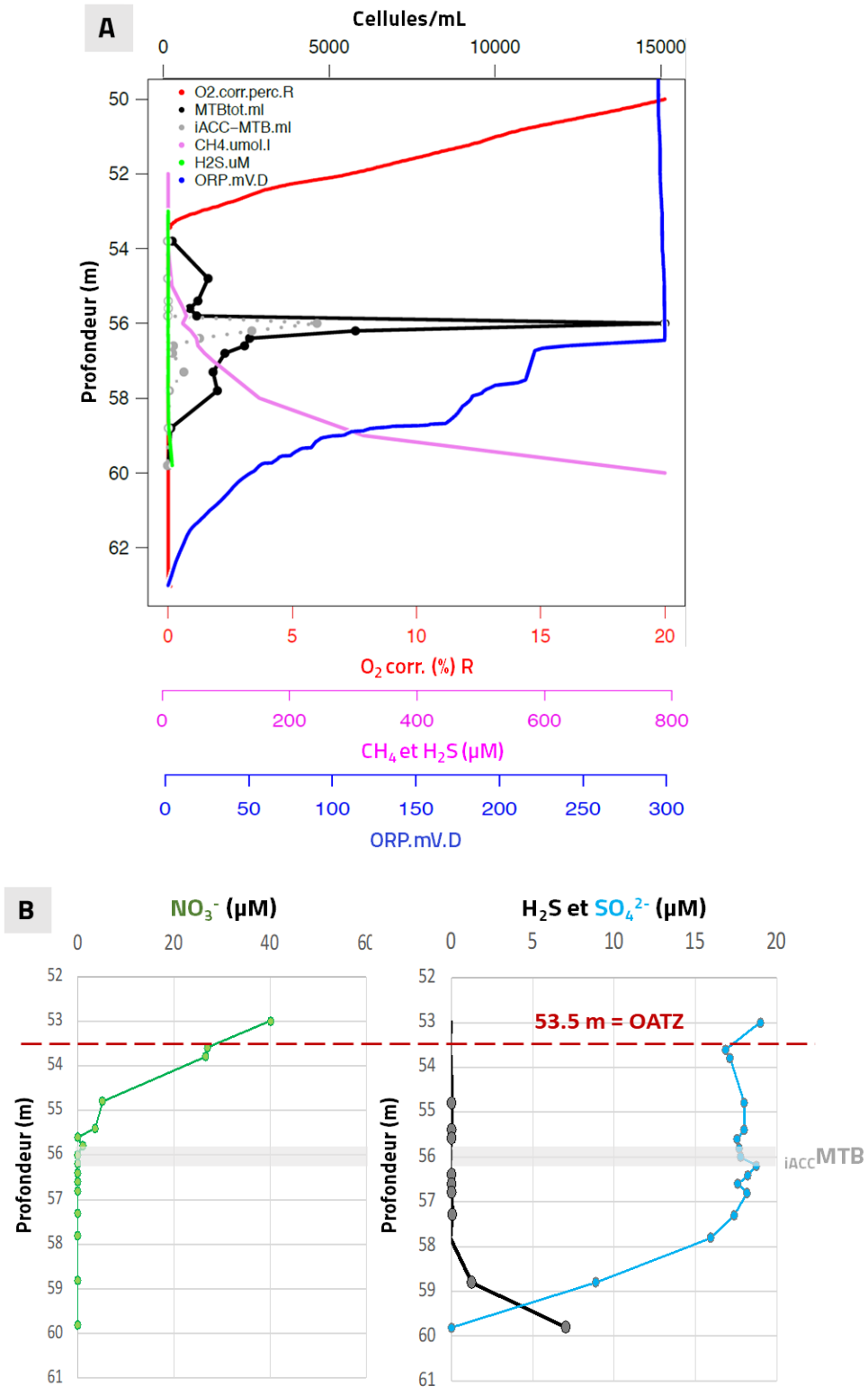


Figure 108 : A) Profil des concentrations des MTBc et des iACCMTB (cellules/mL) pour 15 profondeurs échantillonnées (54.25-57.25 m). B) Profils de concentration des nitrates (NO_3^-), des sulfates (SO_4^{2-}) et du H_2S en µM mesurées entre 54.25 et 57.25 m de profondeur. Les profils ont été réalisés pendant la mission en été 2022 (**Juillet 2022, Mx70**).



<u>Figure 109</u> : Relations entre l'abondance des populations de MTB et certains paramètres géochimiques dans la colonne d'eau du lac Pavin pendant la mission de Juillet 2021, Mx66). A) Profil des concentrations des MTB totales (incluant $_{iACC}$MTB et MTBc essentiellement) et des $_{iACC}$MTB (cellules/mL) pour 15 profondeurs échantillonnées (54-60 m) et des variables géochimiques mesurées dans la colonne d'eau (50-62 m). Les teneurs en dioxygène (O_2) sont exprimées en pourcentage (%), celles du méthane (CH_4) et du sulfure d'hydrogène (H_2S) en µM et celle du potentiel d'oxydo-réduction (ORP) en mV. B) Profils de concentrations des nitrates (NO_3^-), des sulfates (SO_4^{2-}) et du H_2S en µM mesurées entre 53 et 60 m de profondeur.

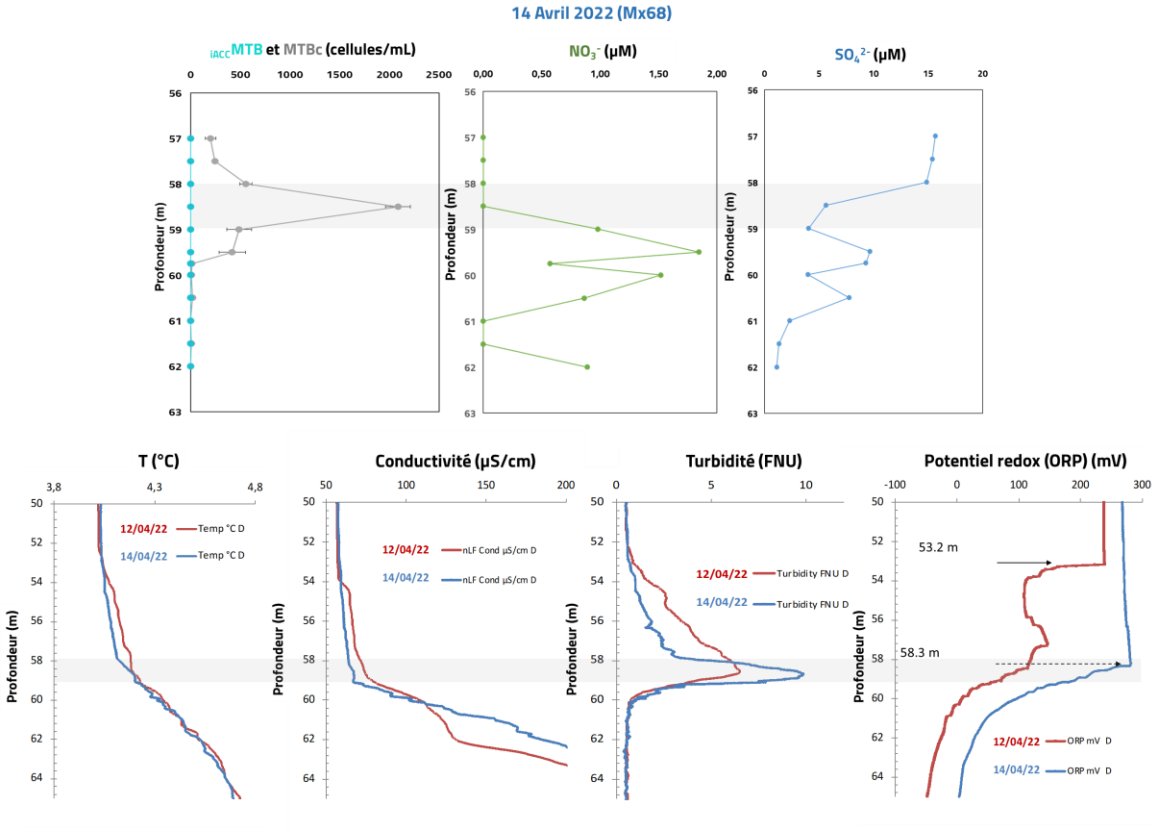


Figure 110 : **Relations entre l'abondance, la structure des populations de MTB et certains paramètres géochimiques dans la colonne d'eau du lac Pavin pendant la mission de Avril 2022, Mx68.** 1ère ligne : Premier profil des concentrations cellulaires des iACCMTB (bleu cyan) et des MTBc (gris) (cellules/mL) pour 11 profondeurs échantillonnées (55-58.5 m) réalisé le 12 Avril et deuxième profil réalisé le 14 Avril sur 12 profondeurs échantillonnées (57-62 m). Profils des concentrations en nitrate (NO_3^-) et sulfate (SO_4^{2-}) mesurées dans la colonne d'eau le 14 Avril 2022 et exprimées en µM. 2ème ligne : Profils verticaux de la température (T°C), de conductivité (µS/cm), de turbidité (FNU) et du potentiel redox (ORP) en mV. Ces valeurs ont été mesurées entre 50 et 64 m de profondeur dans la colonne d'eau le 12 et le 14 Avril 2022.

3. Niche biogéochimique associée à la présence des iAXCMTB dans les sédiments du lac Pavin

La diversité des iAXCMTB est différente dans la colonne d'eau et le sédiment du lac Pavin. Même si le lieu est le même, le gradient biogéochimique semble être différent. Durant ma thèse, j'ai essentiellement travaillé sur des carottes de sédiment du lac Pavin pour comprendre les conditions environnementales dans lesquelles coexistent les communautés de iACCMTB et de iABCMTB dans les sédiments du lac Pavin, et déterminer leur localisation exacte. En effet, plusieurs questionnements persistent : *où se trouve l'OATZ dans le sédiment ? Où sont distribuées les populations de iAXCMTB par rapport à cette OATZ* ? Nous avons dans un premier temps tenté de réaliser des carottes dans les sédiments peu profonds, mais il n'a pas été possible de prélever de carottes de qualité satisfaisante à cause de la nature sablonneuse du sédiment peu profond et de la présence de galets (**Figure 111**). **Une autre profondeur a donc été sélectionnée sur la base d'aspects structuraux**. Les sédiments profonds sont en général moins perturbés et plus adaptés au carottage de par leur nature plus cohésive qui permet de conserver la structure des gradients chimiques et microbiens lors de la remontée des carottes. D'autre part, ils sont plus représentatifs de l'ensemble des sédiments du lac. Nous avons donc fait

une exploration du sédiment en collectant plusieurs échantillons à 20 m de profondeur au niveau d'un plateau situé au Sud. Les premières observations en MO et MEB montrant la présence des iAXCMTB à cette profondeur, nous avons mené une étude plus approfondie à partir de plusieurs carottes collectées sur plusieurs missions.



Figure 111 : **Essais de carottage réalisés avec Eric Viollier dans les sédiments superficiels du lac Pavin (LP1) présentant une structure trop sablonneuse pour le carottage**.

Nous avons collecté et analysé plusieurs carottes sédimentaires lors des missions Mx67 (Octobre 2021), Mx68 (Avril 2022), Mx70 (Juillet 2022) et Mx71 (Novembre 2022), dont 8 (i.e. 2 par mission) ont fait l'objet d'une caractérisation physicochimique au niveau de plusieurs sections de 1 cm entre la surface du sédiment et jusqu'à 10 cm de profondeur. Un dépôt de 2-4 cm de débris organiques recouvraient le sédiment. La surface du sédiment correspond donc au début de la phase minérale, une fois les débris enlevés. Toutes les carottes n'ont pas servi pour toutes les analyses. Parfois, différentes carottes ont été utilisées pour différentes mesures. Dans la mesure du possible et selon le nombre de carottes échantillonnées, nous avons préparé des grilles de microscopie électronique pour différentes tranches de sédiment pour des observations au MET/MEB et des analyses STEM-XEDS. L'observation des communautés microbiennes dans ces échantillons a révélé de nombreuses populations de MTB, dont certaines formaient des inclusions réfringentes. Les analyses STEM-XEDS couplées aux autres analyses de microscopie ont montré que cette profondeur de sédiment (i.e. 20 m) était propice à la présence des MTB formant des iACC et iABC (**Figure 112**).

Nous avons ensuite estimé la distribution des populations de iAXBMTB en fonction de la profondeur de la carotte lors de la mission Mx71 (**Figure 113**) au MO. A ce jour, nous ignorons le volume d'eau interstitielle contenu dans chaque tranche de sédiment, c'est pourquoi nous avons compté un **nombre moyen de cellules pour chaque section de 1 cm de sédiment**. Ces observations montrent la présence de iACCMTB identiques aux *Azospirillaceae* spp. et aux *Gammaproteobacteria spp*. des morphotypes 1, 3 et 4, quelques

$_{iABC}$MTB de différents morphotypes dans la première tranche de 1 cm, ainsi que d'une grande diversité d'autres MTB (~ 10^4-10^5 cellules/mL suivant les échantillons). Alors qu'elles étaient minoritaires dans le premier centimètre de sédiment, les $_{iABC}$MTB augmentent d'un facteur 10 dans la deuxième tranche. Après 3 cm, le nombre de $_{iAXC}$MTB diminue et à partir de 5 cm et 6 cm de profondeur, les populations de $_{iACC}$MTB sont peu abondantes voire quasi-absentes (**Figure 113**). **Il semblerait donc qu'il y ait une stratification des $_{iACC}$MTB et $_{iABC}$MTB dans les sédiments en fonction de la profondeur**.

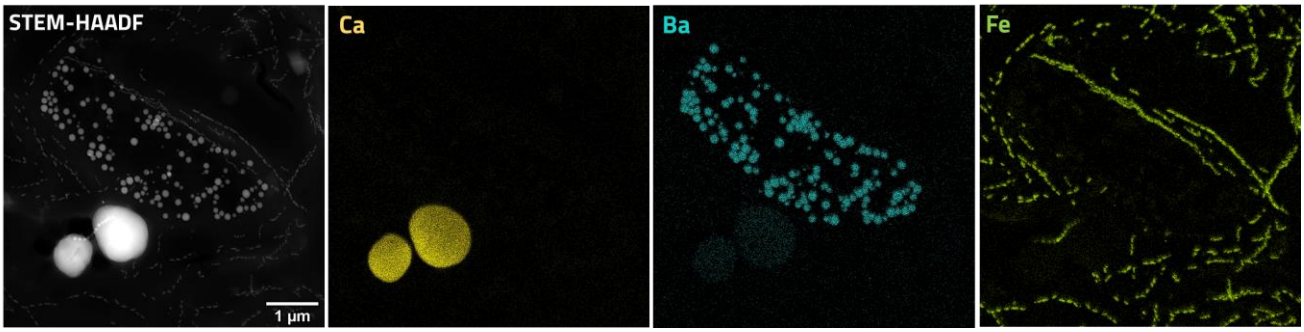


Figure 112 : **Analyse de $_{iACC}$MTB et de $_{iABC}$MTB dans la première tranche de sédiment (1 cm) d'une carotte sédimentaire prélevée à 20 m de profondeur lors de la mission d'Avril 2022, Mx68.** Identification de la composition chimique des inclusions des morphotypes de MTB dans les sédiments à 20 m de profondeur grâce à la cartographie élémentaire réalisée à partir d'images STEM-HAADF. Cartographie élémentaire XEDS du calcium (Ca), baryum (Ba) et du fer (Fe). Ces analyses ont été effectuées à l'IMPMC (Paris) avec Nicolas MENGUY.

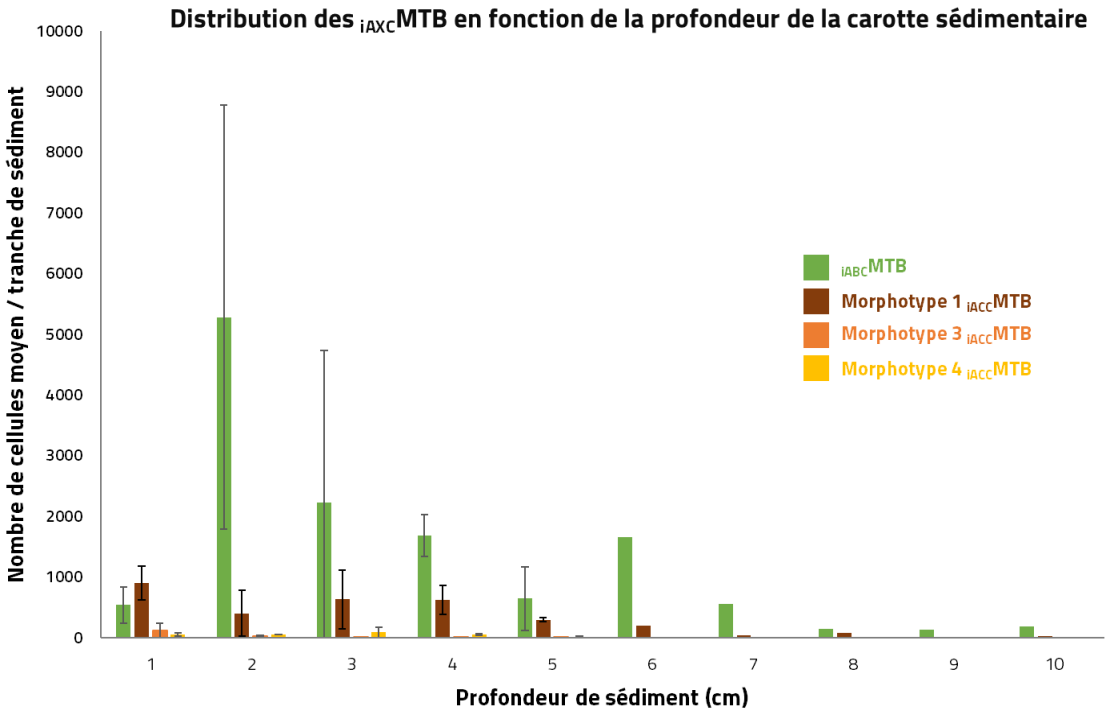


Figure 113 : **Distribution des populations de $_{iAXC}$MTB dans une carotte de sédiment de 10 cm prélevée à 20 m de profondeur dans le lac Pavin lors de la mission de Novembre 2022, Mx71.** Le nombre moyen de cellules représentatives des populations de $_{iABC}$MTB et des populations de $_{iACC}$MTB (i.e. morphotype 1, 3, 4) a été compté dans l'eau interstitielle de chaque tranche de sédiment (1 à 10 cm). Chaque tranche de sédiment (1 cm) est divisée en 3 aliquotes à partir desquelles les MTB ont été comptées. Les valeurs représentent des moyennes, sauf à partir des tranches de 6 cm de profondeur. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-type.

Les profils d'oxygène dissous réalisés pendant les missions Mx67 et Mx70 montrent que les concentrations en oxygène commencent à décroitre progressivement à partir de 3 mm de profondeur (**Figure 114A**). L'oxygène a même totalement disparu bien avant la fin du premier centimètre de sédiment (i.e. de la première tranche). L'OATZ du sédiment est donc très fine et juste en dessous de l'interface eau-sédiment. Le profil du potentiel redox réalisé lors de la mission Mx68 est similaire à celui de l'oxygène, et indique que la solution se réduit très rapidement avec la profondeur (**Figure 114B**). Le profil du pH ne fluctue pas et gravite autour d'une valeur neutre de 7. Les teneurs en carbone inorganique dissous (DIC) augmentent en fonction de la profondeur, bien qu'il existe une variabilité selon les carottes sédimentaires échantillonnées (Mx67 et Mx68) (**Figure 115**). En effet, le profil montre deux pics à 3 cm et 9 cm pour les carottes de Mx68, et à 4 cm et 6 cm pour les carottes de Mx67 (**Figure 115**). Ces résultats indiquent que **les $_{iAXC}$MTB se développent dans un milieu réduit en complète anoxie sur plusieurs centimètres bien en dessous de l'OATZ** et pas uniquement proche de l'OATZ. D'autre part, ils suggèrent que les **$_{iABC}$MTB ont une niche écologique légèrement différente.**

La distribution des ions nitrates (NO_3^-) en fonction de la profondeur de la carotte a également suscité notre attention. Les profils de NO_3^- des carottes analysées ne sont pas homogènes entre carottes, mais les concentrations détectées sont très fortes aux profondeurs 2 cm (~60 µM pendant Mx70) et 7 cm (~40 µM pendant Mx71) (**Figure 115**). Juste après ce pic de concentration, les teneurs en NO_3^- décroient progressivement.

Nous nous sommes demandés si la prédominance des $_{iABC}$MTB par rapport aux $_{iACC}$MTB à partir du 2ème centimètre pouvait être reliée à des plus fortes concentrations en métaux alcalino-terreux (AEM), notamment le baryum. Les profils du calcium (Ca), baryum (Ba) et strontium (Sr) présentent la même tendance : (i) les plus fortes concentrations sont localisées au niveau de la première tranche de sédiment (jusqu'à 300 µM, 0,14 µM et 1 µM, respectivement), (ii) les concentrations restent stables tout le long de la carotte sédimentaire et (iii), les concentrations ne fluctuent pas en fonction de la date d'échantillonnage de la carotte (**Figure 115**). Ces profils montrent également que le Ba et le Sr sont à l'état de traces dans le sédiment du lac Pavin et en concentration bien moins importante que le Ca. On suppose donc que des mécanismes d'assimilation spécifiquement dirigés vers le Ba sont présents chez les $_{iABC}$MTB.

Ces résultats montrent donc que les concentrations en Ca, Ba et Sr ne sont pas un facteur limitant pour expliquer la présence ou l'absence des $_{iAXC}$MTB dans le sédiment. En revanche, les profils du phosphore (P) et du fer (Fe) montrent une fluctuation en fonction de la profondeur. En effet, les concentrations de P et de Fe augmentent considérablement le long de la carotte, jusqu'à atteindre une teneur deux fois plus élevée à 10 cm. Ces profils semblent être corrélés entre eux, suggérant la présence de phosphates de fer à ces profondeurs (**Figure 115**).

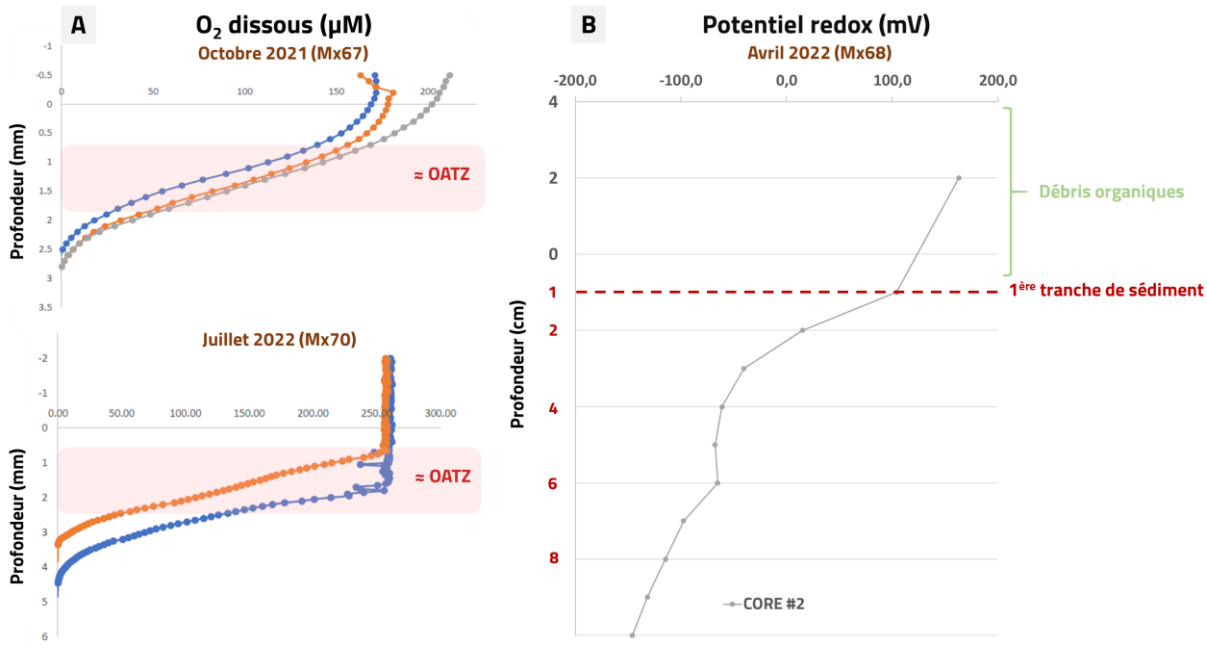
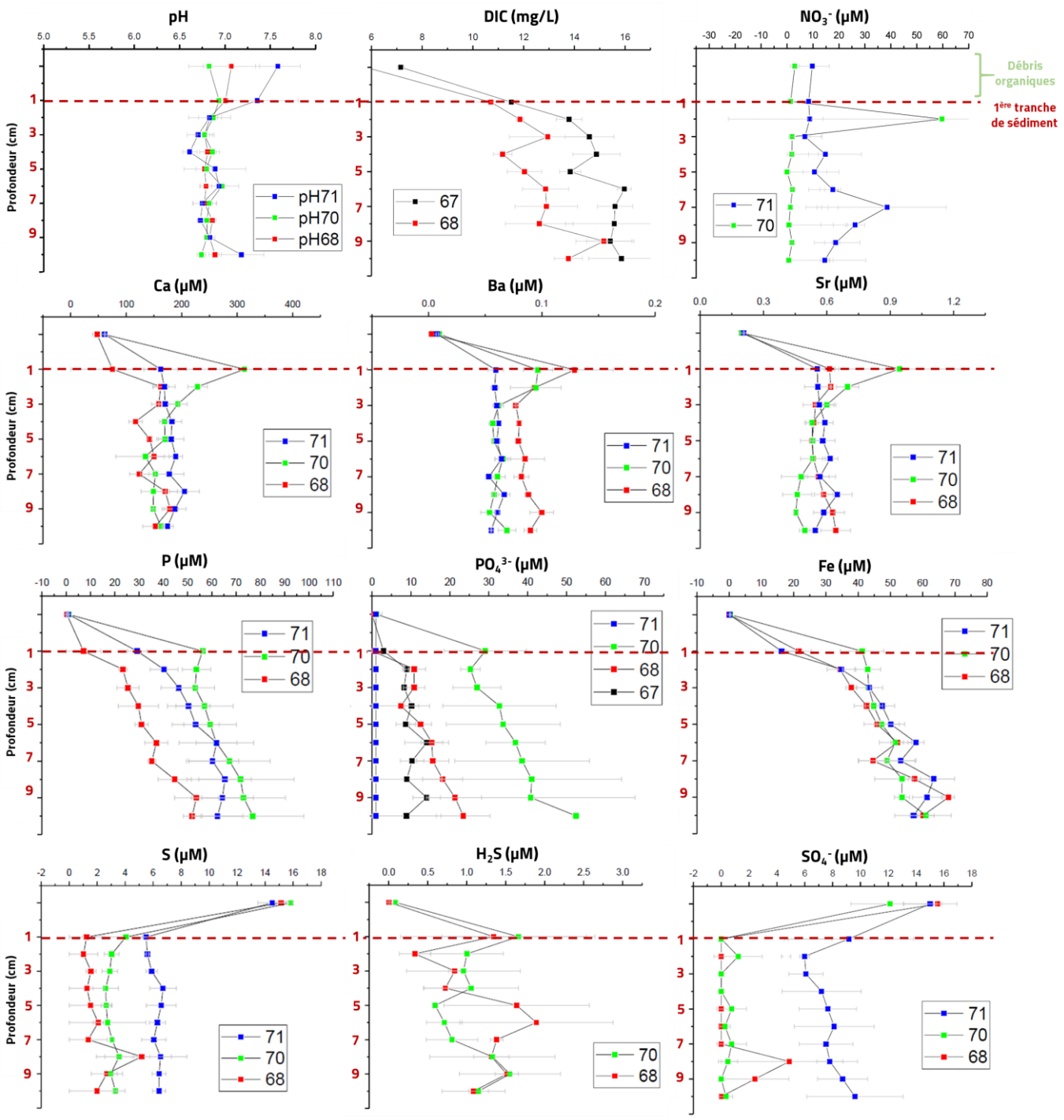


Figure 114 : **Profils d'oxygène dissous (µM) et du potentiel redox (mV) dans l'eau interstitielle du sédiment à 20 m de profondeur.** A) Profils de l'oxygène dissous (µM) dans les premiers millimètres de profondeur du sédiment réalisés lors de la mission Mx67 et Mx70. La profondeur de la zone de transition oxique-anoxique (OATZ) est estimée à partir de ces concentrations (zone colorée en rouge). La ligne rouge tracée en pointillé représente la première tranche de sédiment (1 cm). B) Profil du potentiel redox (mV) en fonction de la profondeur de la carotte de sédiment (10 cm). La ligne rouge en pointillée représente la première tranche de sédiment. La zone juste au-dessus représentée en vert, correspond à l'épaisseur de débris organiques grossiers qui n'a pas été pris en compte dans la réalisation des tranches de sédiment.

Nous nous sommes également intéressés à la spéciation du soufre dans l'eau interstitielle des sédiments étant donné que certaines iACCMTB et iABCMTB pourraient être sulfoxydantes et sulfatoréductrices, respectivement. Le profil du soufre (S) montre des concentrations relativement stables avec la profondeur malgré des concentrations différentes en fonction de la carotte (entre 2 et 6 µM, **Figure 115**). Les profils de H_2S des deux carottes analysées ne sont ni homogènes entre carottes, ni stables avec la profondeur, mais les concentrations détectées sont très faibles (1-1.5 µM) (**Figure 115**). Les profils des sulfates (SO_4^-) présentent une tendance similaire, sauf pour la carotte de la mission Mx68 pour laquelle un pic de 5µM a été observé au 8ème cm. Sans que nous puissions l'expliquer, les teneurs en SO_4^- sont trois fois plus élevées dans les carottes de la mission Mx71 par rapport aux autres missions (**Figure 115**). L'ensemble de ces profils montre qu'il existe une certaine variabilité entre les paramètres physico-chimiques, bien que les carottes aient été échantillonnées à la même profondeur.



<u>Figure 115</u> : Profils géochimiques de l'eau interstitielle du sédiment collecté à 20 m de profondeur dans le lac Pavin. Les numéros de mission d'échantillonnage des carottes (e.g. Mx68 = 68) sont affichés pour chacun des profils. Un minimum de deux à trois carottes a été utilisé pour la construction de chaque profil. Les points représentent les moyennes, et les barres d'erreur représentent les écarts-types standards. La 1ère ligne représente les profils du pH, des teneurs en carbone inorganique dissous (DIC) en mg/mL et des teneurs en nitrate (NO_3^-) en µM. Les concentrations de NO_3^- était inférieures au seuil de détection pour Mx68 probablement dû à la nécessité de diluer les échantillons. La 2ème ligne représente les profils de concentration des métaux alcalino-terreux : calcium (Ca), baryum (Ba) et strontium (Sr) en µM. La 3ème ligne représente les profils de concentration du phosphore (P), phosphate (PO_4^{3-}) et du fer (Fe) en µM. Enfin, la 4ème ligne représente les profils de concentration du soufre élémentaire (S), du sulfure d'hydrogène (H_2S) et du sulfate (SO_4^-) en µM. La ligne rouge en pointillée indique la première tranche de 1 cm de sédiment échantillonnée tandis que la zone au-dessus correspond à la zone oxygénée composée de débris organiques.

Nous avons analysé la diversité des phases minéralogiques composant le sédiment à 20 m et notamment sur la spéciation du calcium. Plusieurs de ces analyses sont encore en cours de traitement. C'est pourquoi, je présente uniquement ici les analyses de diffraction des rayons X (DRX), réalisées par Neha Mehta à l'IMPMC, Paris. Les analyses ont été réalisées sur des échantillons de sédiment prélevés lors de la mission d'octobre 2021, Mx67. Les principales phases minérales identifiées sont le mica, l'hydroxyapatite, le feldspath, le pyroxène et le quartz (**Figure 116**). L'hydroxyapatite est une espèce minérale de la famille des phosphates de calcium tandis que les autres minéraux sont de la famille des silicates. Ces résultats ne nous indiquant pas sous quelle forme minérale le Ca est présent dans le sédiment, des futures analyses au synchrotron XAS sont envisagées afin de mieux contraindre la spéciation du Ca sédimentaire.

Enfin, d'autres analyses (non présentés dans ma thèse) suggèrent également que l'eau interstitielle des sédiments profonds est un environnement sous-saturé en $CaCO_3$ tout comme l'eau interstitielle des sédiments du bord (Monteil et al., 2021).

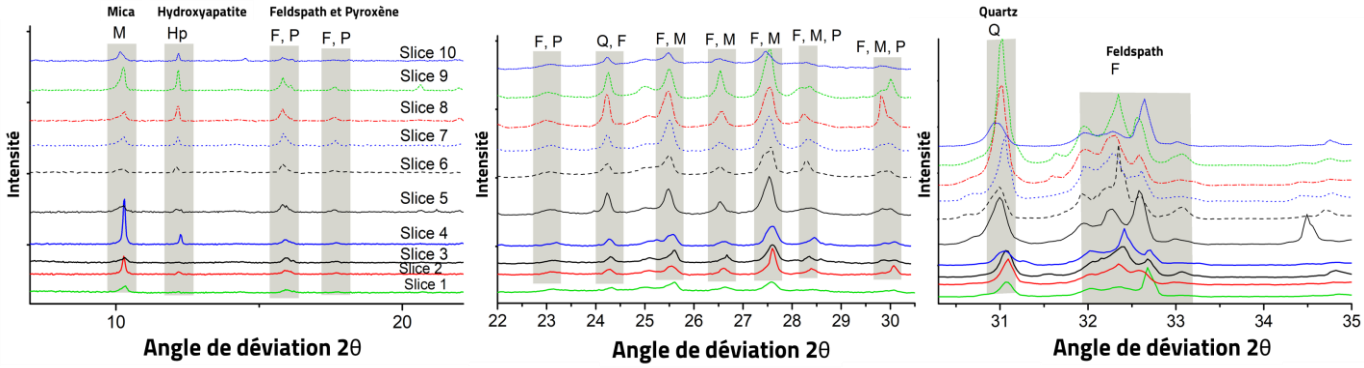


Figure 116 : **Analyse de diffraction des rayons X (DRX) des phases minérales majeures composant le sédiment à 20 m de profondeur**. Diffractomètres mesurant l'intensité des rayons X en fonction de l'angle 2θ de déviation pour chaque tranche de sédiment (tranche 1 à tranche 10 cm). Les phases minérales détectées sont le Mica (M), Hydroxyapatite (Hp), Feldspath (F), Pyroxène (P) et Quartz (Q).

4. Identification des milieux aquatiques propices à la présence de iACCB

4.1. Observation de populations de iACCB non magnétotactiques dans la zone oxique des sédiments profonds

Nous avons également observé les communautés microbiennes du sédiment profond au MO directement sans concentration magnétique pour rechercher la présence d'éventuelles cellules d'*Achromatium* spp.. Nous avons d'abord regardé dans le tapis très organique au-dessus du sédiment minéral. Ce tapis microbien est composé de nombreux débris de diatomées, de filaments et de cellules de formes différentes (**Figure 117A**). Nous avons été surpris de trouver parmi ces cellules, non pas des cellules *Achromatium-like,* mais des bactéries mobiles non magnétotactiques ayant des inclusions réfringentes ressemblant aux *Azospirillaceae* spp. de morphotype 1 et 5. L'observation au MET de

cellules triées par micromanipulation a permis de confirmer l'absence de magnétosomes dans leur cytoplasme (**Figure 117B**).

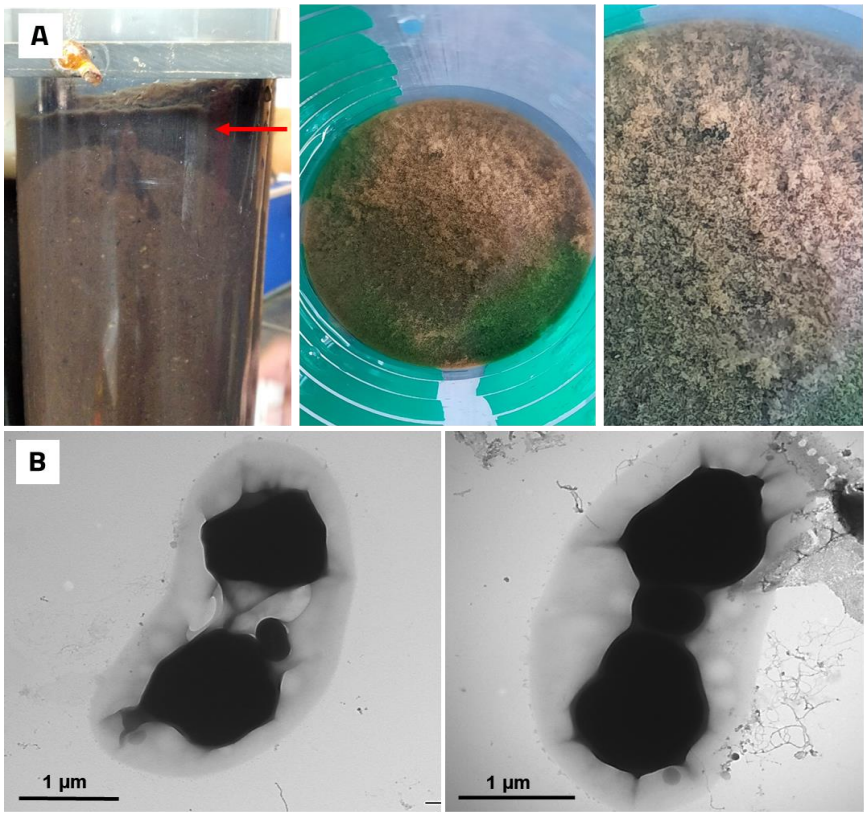


Figure 117 : **Découverte d'une iACCB non magnétotactique dans la zone oxique des sédiments à 20 m.** A) Photographies d'une carotte sédimentaire où la zone oxique (représentée par une flèche rouge) est caractérisée par la présence de débris organiques. B) Images de MET de ces bactéries formant des inclusions denses aux électrons, similaires aux morphotypes 1 et 5 de iACCMTB.

L'analyse chimique des inclusions réalisée au MEB à l'IMPMC par Arnaud Duverger (post-doctorant actuellement en contrat à l'IMPMC) nous a confirmé que cette bactérie forme des iACC et pourrait ainsi appartenir à une nouvelle espèce de iACCB (**Figure 118**). Ces iACCB non magnétotactiques sont représentées par un seul morphotype dans le tapis microbien de la zone oxique des sédiments profonds et semblent abondantes. Excepté l'absence de magnétosomes, ce morphotype présente un phénotype très similaire au morphotype 1 des sédiments du bord et au morphotype 5 de la colonne d'eau (i.e. bâtonnet de 4 µm de longueur formant 2 à 4 inclusions denses aux électrons) caractérisés dans le premier chapitre.

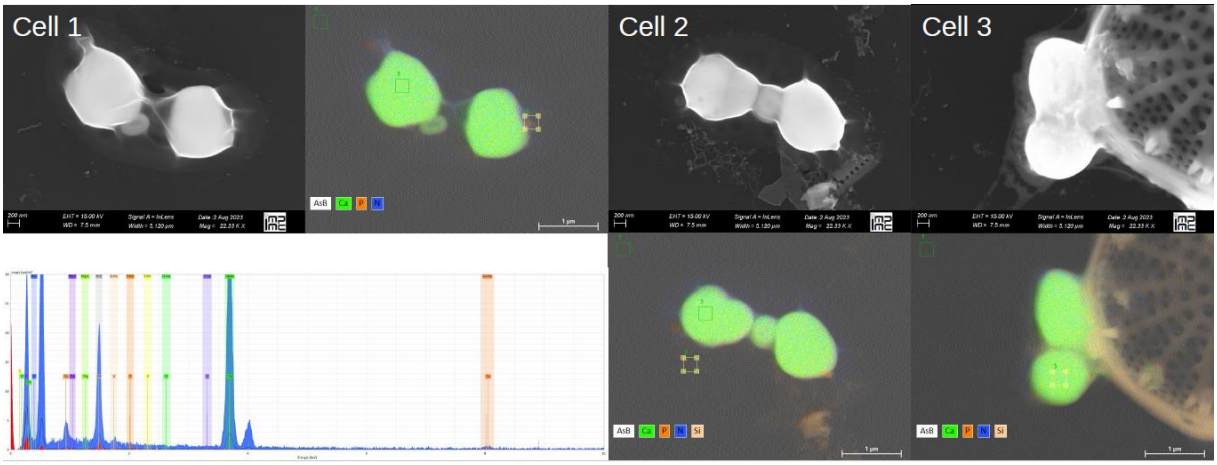


Figure 118 : Analyse au MEB de iACCB de la zone oxique des sédiments à 20 m. Les iACCB ont été isolées sur une grille de microscopie électronique par micromanipulation sous microscope optique. L'analyse XEDS indique la présence de calcium (Ca) et l'absence de phosphore (P) indiquant que les inclusions sont vraisemblablement des iACC. Cette analyse a été réalisée par Arnaud DUVERGER à l'IMPMC, Paris.

Plusieurs cellules uniques triées au micromanipulateur ont permis d'identifier ces populations de iACCB et de les comparer avec les morphotypes de iACCMTB observés dans les sédiments superficiels et la colonne d'eau. Le séquençage de l'ADNr 16S et son alignement avec les séquences des bases de données Genbank suggèrent que cette iACCB est affiliée à la famille des *Azospirillaceae* de la classe des *Pseudomonadota* tout comme plusieurs iACCMTB. Un arbre phylogénétique de la famille des *Azospirillaceae* basé sur ce même gène a été réalisé afin de connaître les relations de parenté entre cette iACCB et les autres espèces de iACCMTB (**Figure 119**).

Cet arbre suggère que les iACCMTB isolées dans la colonne d'eau sont les bactéries les plus proches génétiquement des iACCB isolées du tapis microbien de la zone oxique du sédiment. Les iACCB formeraient une nouvelle espèce au sein des *Azospirillaceae.* Sa séquence d'ADNr 16S partage 95% d'identité avec celle de l'iACCMTB de la colonne d'eau alors qu'elle ne partage que ~ 92% d'identité avec celles des iACCMTB du morphotype 1 du sédiment du bord. Ces résultats sont intéressants car la zone anoxique sous l'OATZ de la colonne d'eau et la zone oxique des sédiments profonds sont deux environnements géochimiques très différents. Encore une fois, il est difficile d'aller plus loin dans les interprétations à ce stade car la topologie de l'arbre n'est pas bien soutenue. Seul le séquençage de génome (en cours) nous permettra d'en savoir plus, notamment sur l'éventuelle capacité de cette iACCB à synthétiser des magnétosomes (i.e. présence dans son génome des gènes impliqués dans la formation des magnétosomes).

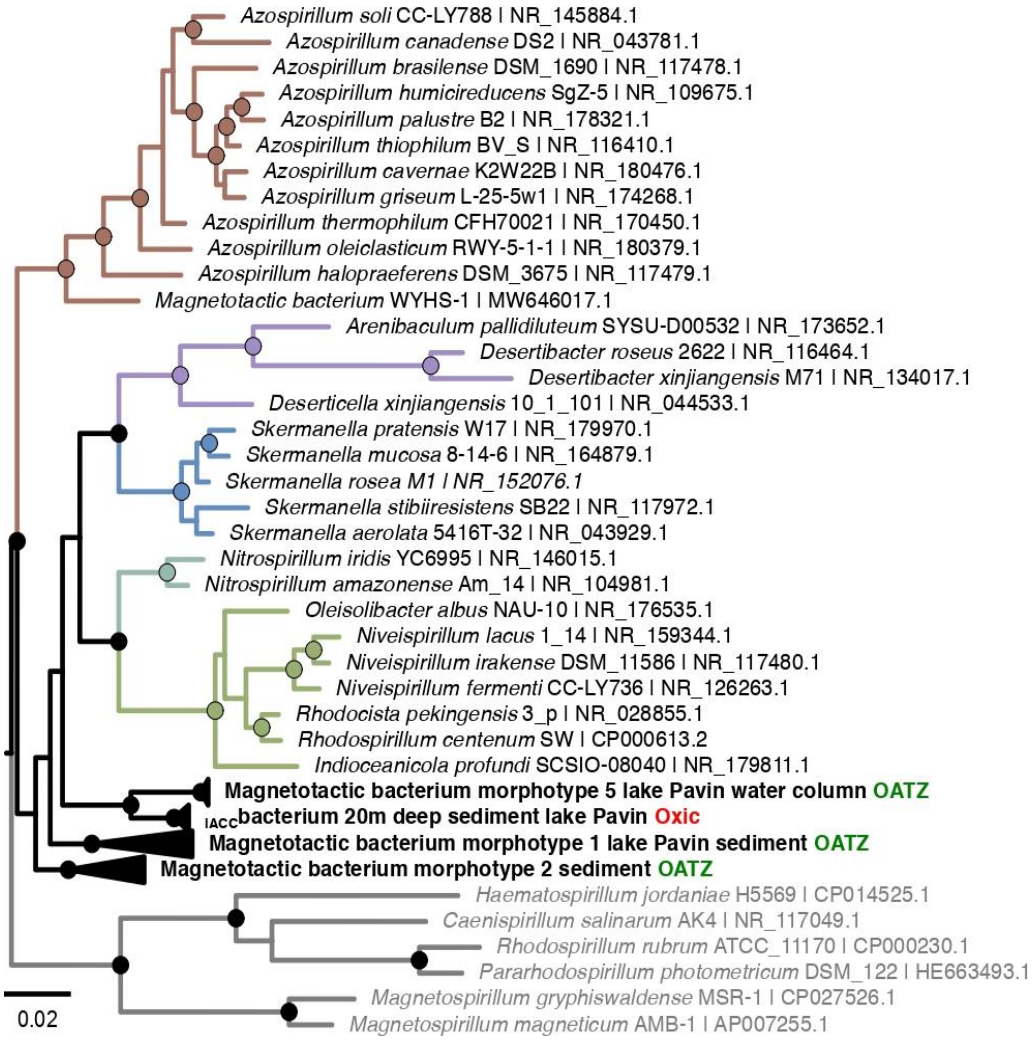


Figure 119 : **Arbre phylogénétique basé sur le gène codant pour l'ARNr 16S montrant les relations des iACCMTB de morphotype 1, 2 (sédiment) et 5 (colonne d'eau) avec l'iACCB de la zone oxique, et des autres souches types décrites au sein de la famille des *Azospirillaceae*.** Arbre construit selon la méthode du maximum de vraisemblance raciné avec des membres représentatifs des *Rhodospirillaceae* (groupe gris). La longueur des branches représente le nombre de substitutions par site. Les cercles sur les nœuds internes représentent le support statistique considéré comme satisfaisant lorsque le taux de vraisemblance (SH-aLRT) est supérieur à 0.95 (estimé de 1000 réplicas) et la valeur de *bootstrap* non paramétrique est supérieure à 80% (estimée de 500 réplicas). Les iACCMTB sont en gras. La séquence de la bactérie magnétotactique formant des phosphates de calcium WYHS-1 a été également ajoutée (Li et al., 2021).

4.2. Observation de iACCMTB dans une zone humide et acide

Pendant la campagne d'échantillonnage Mx66, nous avons recherché des MTB dans d'autres environnements autour du lac Pavin dont la tourbière du pont de Clamouze au niveau du ruisseau de Clamouze, située à une dizaine de minute en voiture du lac Pavin (**Figure 120A**). Les eaux des tourbières sont généralement acides et ne sont donc pas propices à la précipitation de carbonate. A l'aide d'une sonde multiparamétrique (WTW 3630 T-Cond.-pH-O_2), nous avons relevé plusieurs paramètres physicochimiques *in situ* dont la température (i.e. 12,5°C), le pH (i.e. 4,02), la conductivité (i.e. 35 µS/cm), l'O_2 dissous (8,27 mg/mL) et l'alcalinité (291 µM). Les prélèvements d'eau porale effectués

directement sur le site de prélèvement, en cours d'analyse à l'IMPMC, nous apporteront plus d'informations sur la géochimie de cet environnement.

Les analyses de MO des communautés concentrées magnétiquement ont révélé uniquement la présence de deux morphotypes de MTB: des longs spirillum fins ressemblant à des bactéries du genre *Magnetospirillum* et des bâtonnets avec 2 ou 3 inclusions très réfringentes ressemblant aux $_{iACC}$MTB des morphotypes 1 et 5 affiliées à la famille des *Azospirillaceae*. Les analyses MET nous ont permis de confirmer cette forte ressemblance au niveau de l'ultrastructure. Les cellules mesurent ~ 4µm de long, forment 2 ou 3 inclusions très denses aux électrons et une chaîne de magnétosomes prismatiques rectangulaires (**Figure 120B**). Les analyses de STEM-XEDS ont confirmé que ces inclusions sont bien des $CaCO_3$ (**Figure 121**).

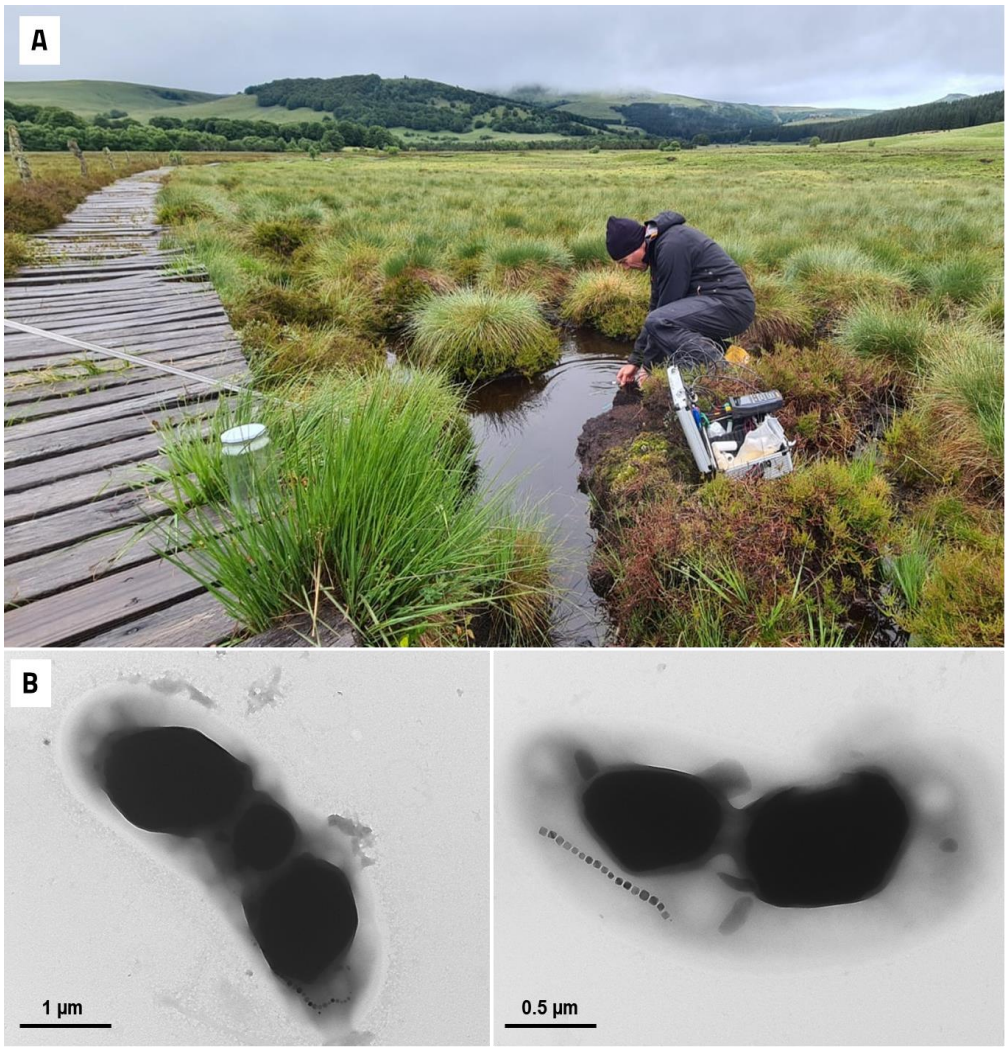


Figure 120 : A) Photographie de la tourbière du pont de Clamouze sur laquelle Didier Jézéquel est en train de réaliser des mesures avec une sonde multiparamétrique. B) Images de MET montrant une MTB avec des inclusions denses aux électrons et semblables à celles des morphotype 1 er 5 produisant des $CaCO_3$.

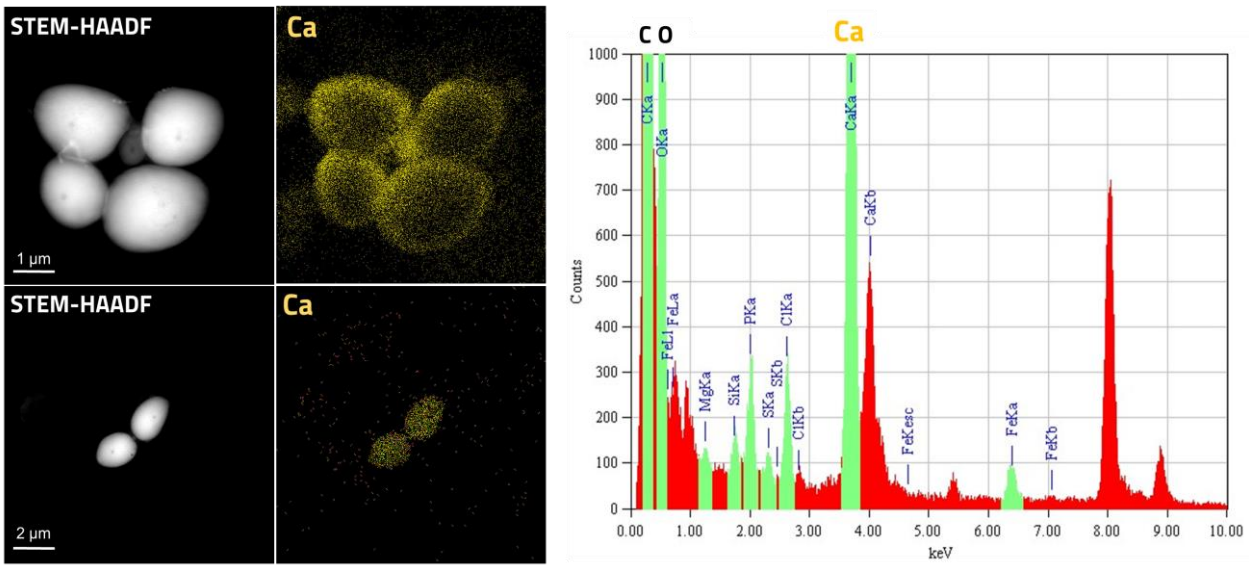


Figure 121 : **Analyses STEM-XEDS de l'iACCMTB dans les sédiments de la tourbière du pont de Clamouze.** Les iACCMTB ont été isolées sur une grille de microscopie électronique par micromanipulation sous microscope optique. L'analyse XEDS indique la présence de calcium (Ca), d'oxygène (O) et de carbone (C) et l'absence de phosphore (P) indiquant que les inclusions sont vraisemblablement des iACC. Ces analyses ont été réalisées avec Nicolas MENGUY, à l'IMPMC.

Des cellules uniques ont été triées au microscope optique avec un micromanipulateur afin d'identifier ces populations de iACCMTB par séquençage de l'ADNr 16S. Deux OTUs ont été obtenues. Les meilleurs alignements de ces OTUs ont été obtenus avec des séquences d'*Azospirillaceae* dont la iACCMTB de morphotype 1 décrite par Monteil *et al.* (2021).

Ces séquences ont été placées dans l'arbre phylogénétique des *Azospirillaceae* (**Figure 122**). L'ajout des séquences obtenues pour cette iACCMTB (i.e. *morphotype 1 Clamouze Peatland*) a changé la topologie de l'arbre (e.g. **Figure 119**) qui n'est pas pour autant mieux soutenue. **Les iACCMTB des tourbières formeraient une, voire deux, nouvelles espèces au sein des *Azospirillaceae* partageant 96% d'identité au niveau de leur ADNr 16S avec la iACCMTB de morphotype 1**.

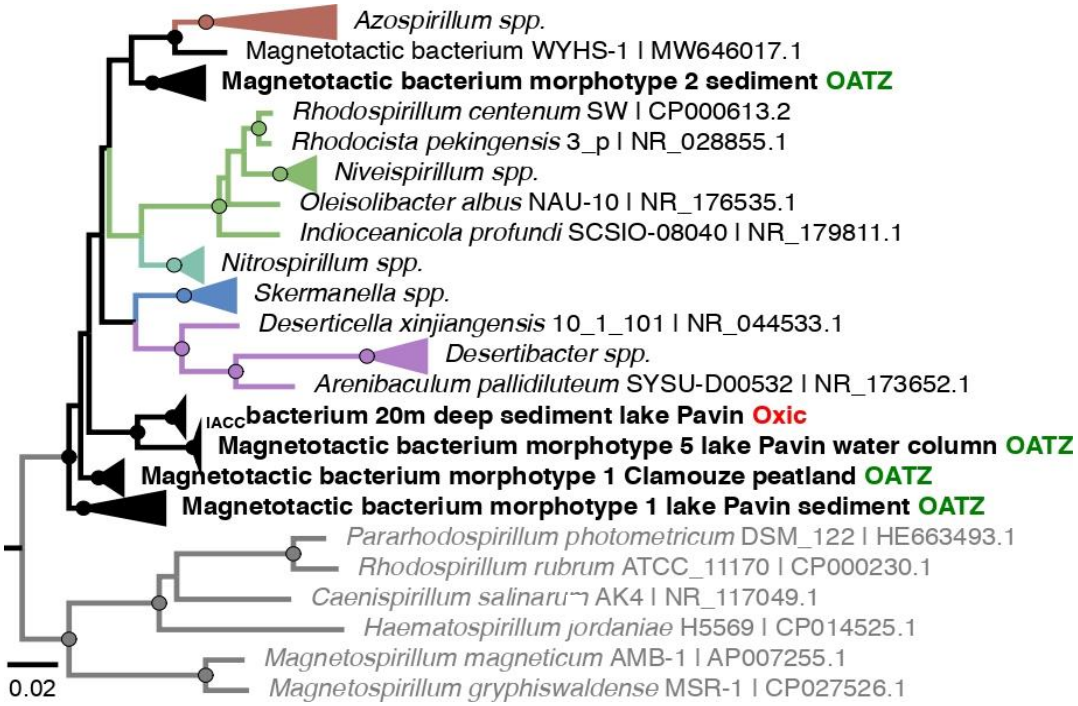


Figure 122 : **Arbre phylogénétique basé sur le gène codant pour l'ARNr 16S montrant les relations entre les iACCMTB de morphotype 1, 2 (sédiment) et 5 (colonne d'eau) et celui de la tourbière de Clamouze, avec la iACCB de la zone oxique et des autres souches types décrites au sein de la famille des *Azospirillaceae*.** Arbre construit selon la méthode du maximum de vraisemblance raciné avec des membres représentatifs des *Rhodospirillaceae* (groupe gris). La longueur des branches représente le nombre de substitutions par site. Les cercles sur les nœuds internes représentent le support statistique considéré comme satisfaisant lorsque le taux de vraisemblance (SH-aLRT) est supérieur à 0.95 (estimé de 1000 réplicas) et la valeur de bootstrap non paramétrique est supérieure à 80% (estimée de 500 réplicas). Les iACCMTB sont en gras. La séquence de la bactérie magnétotactique formant des phosphates de calcium WYHS-1 a été également ajoutée (Li et al., 2021).

4.3. Exploration d'autres milieux aquatiques

J'ai eu l'occasion d'explorer les sédiments d'autres milieux aquatiques pour voir si de nouvelles iACCMTB pouvait être découvertes. La présence ou l'absence de iACCMTB m'a permis d'identifier certains environnements propices à la carbonatogenèse intracellulaire. Nous avons exploré les sédiments d'autres types d'environnements aquatiques en France provenant (i) du lac Aydat et des zones humides du lac Aydat (Puy-de-Dôme) (ii) de la Mer Méditerranée à Carry-le-Rouet, (iii) de la rivière de la Dordogne (Limousin). Ces environnements ont été sélectionnés principalement par opportunisme du fait de la proximité de ces sites avec le lac Pavin ou des lieux d'échantillonnage utilisés pour d'autres projets au laboratoire.

D'autres environnements aquatiques ont également été explorés par notre équipe dans plusieurs départements de France, dont le lac d'Esparron-de-verdon (Alpes-de-Haute-Provence), le Grand Laoutien et le lac de Vins-sur-Caramy (Var), lac de Peyrolles (Bouches-du-Rhône), le lac d'Issarlès (Ardèche), la plage d'Arone (Piana, Corse).

Nous avons observé la présence des populations de iABCMTB dans les sédiments du lac Aydat (**Figure 123**) et dans une moindre mesure quelques populations de iACCMTB. Ce dernier a la particularité d'être un **lac dimictique** (Keshri et al., 2018), c'est-à-dire que contrairement au lac Pavin (méromictique), il connait un brassage de ses eaux deux fois

par an, lorsqu'il n'y pas de stratification thermique entre les couches d'eau. Le lac Aydat est eutrophe (Lopes et al., 2010), car il est entouré de terres agricoles et reçoit donc un apport important de matières organiques d'origine terrestre contrairement au lac Pavin. Nous n'avons pas eu l'occasion de faire de prélèvements dans la colonne d'eau lorsque celle-ci était stratifiée. Les populations de MTB produisant des inclusions de carbonate ont été observées à différentes localisations autour du lac dans des sédiments du bord à moins de 1 m de profondeur.

Elsa Turrini a observé au MO la présence de bâtonnets sensibles au champ magnétique et formant entre 2 et 4 grosses inclusions réfringentes dans les sédiments du lac d'Issarlès. Ce dernier présente quelques similitudes avec le lac Pavin : il s'agit d'un **lac de cratère** volcanique en Ardèche (i.e. maar) dont la profondeur moyenne est de 39 m et de profondeur maximale de 108 m (Defive et al., 2023) suggérant un caractère méromictique. Les observations au MET confirment la présence de magnétosomes dans le corps cytoplasmique et la présence de grosses inclusions, très denses aux électrons (**Figure 124**). Les lacs de cratère semblent être des *hot spots* de iACCMTB.

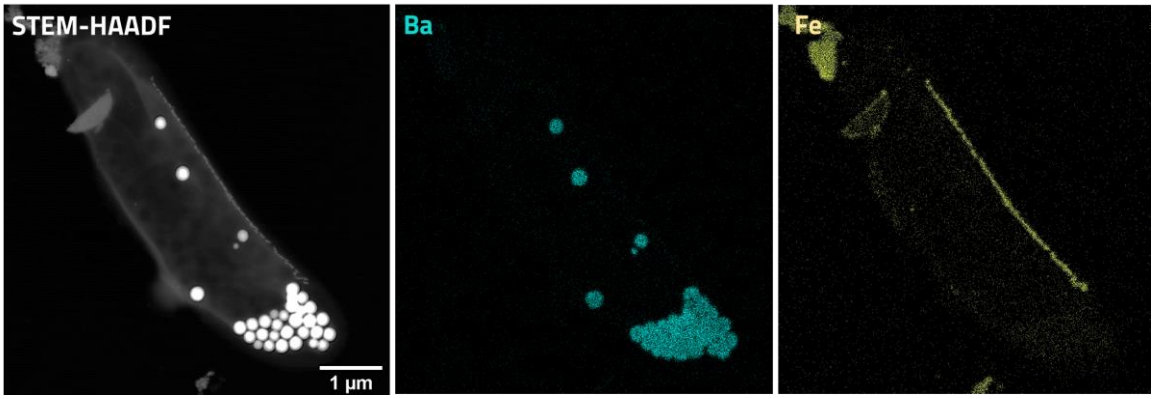


Figure 123 : Analyses STEM-XEDS des iABCMTB dans les sédiments du lac Aydat (dimictique et eutrophe). Les iABCMTB ont été isolées sur une grille de microscopie électronique par micromanipulation sous microscope optique. Les cartographies chimiques indiquent la présence de baryum (Ba) au niveau des inclusions et de fer (Fe) localisé au niveau de la chaîne de magnétosomes suggérant qu'il s'agit d'une iABCMTB.

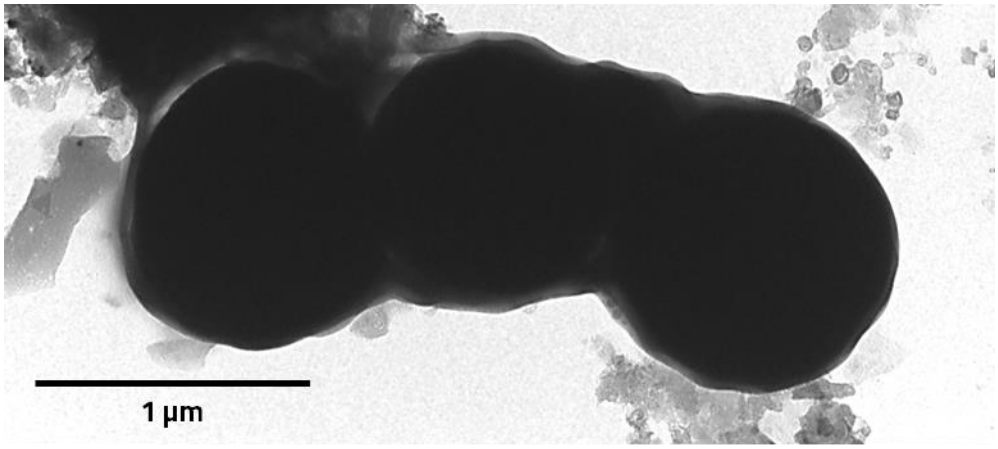


Figure 124 : Image de MET d'une iAXCMTB-like dans les sédiments du lac d'Issarlès (Ardèche). Le prélèvement et la collecte des échantillons de sédiments a été réalisé par Elsa TURRINI, ingénieure d'étude dans notre laboratoire.

Des campagnes d'échantillonnage à Carry-le-Rouet en **mer Méditerranée** ont été réalisées dans le courant de l'année 2021. Les premières observations en microscopie optique et électronique suggèrent la présence de populations de MTB dans les sédiments produisant des carbonates de magnésium amorphes (iAMCMTB) (**Figure 125**). Ces résultats sont très intéressants car c'est la première bactérie observée dans l'environnement marin produisant de telles inclusions. Cette bactérie ressemble aux morphotypes 1 et 5 de iACCMTB. Une ou deux grosses inclusions occupant la majorité de l'espace cytoplasmique sont présentes dans ces cellules. Nous avons observé que la majorité des cellules déposées sur les grilles de microscopie électronique n'ont plus d'inclusion. Il semblerait que ces inclusions soient plus sensibles que les iACC et qu'une dissolution partielle ou totale se fait lors de l'exposition des cellules à l'air (**Figure 125C**). Les premières analyses de typage moléculaire réalisées par mon encadrant de thèse indiquent que cette bactérie appartiendrait aux *Azospirillaceae*.

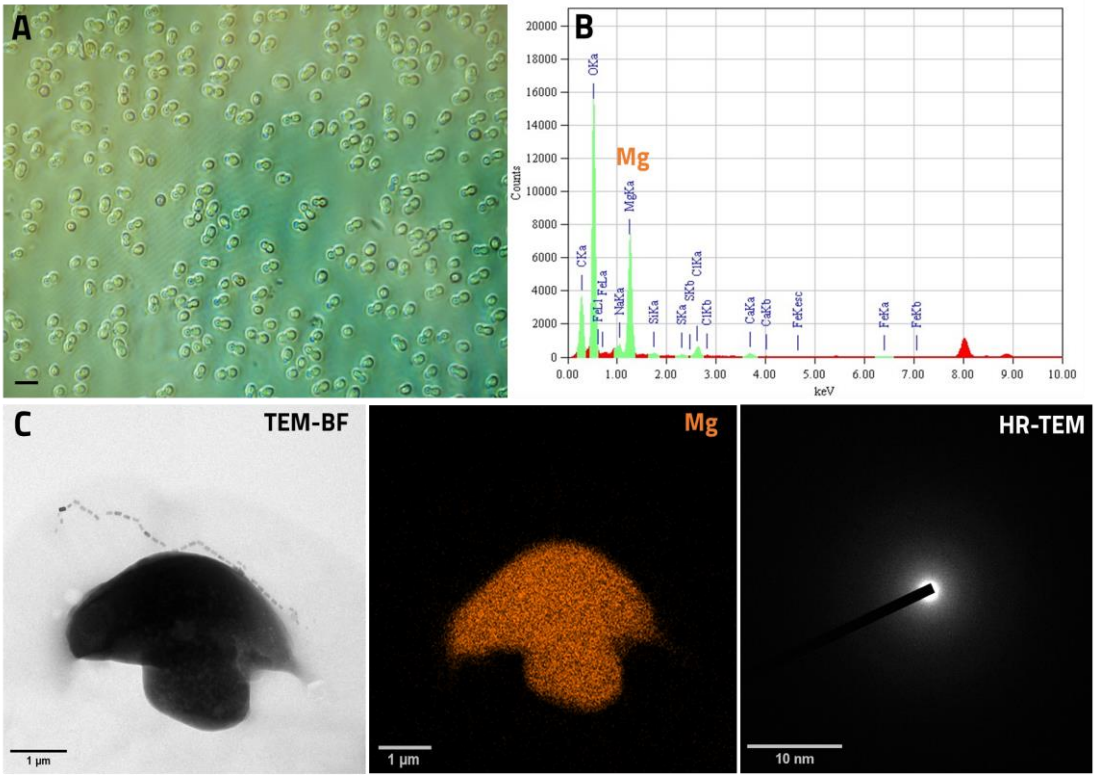


Figure 125 : Observation de iAMCMTB-*like* dans les sédiments en mer Méditerranée (Carry-Le-Rouet). A) Image de MO des populations iAMCMTB-like dans un échantillon de sédiment enrichi ; les bactéries ont un phénotype de bâtonnet allongé (~2-4 µm de longueur) possédant 1 ou 2 inclusions. La barre d'échelle en noir représente 4 µm. B) Spectre XEDS des inclusions d'une iAMCMTB-like, indiquant la présence de magnésium (Mg), d'oxygène (O) et de carbone (C) et l'absence de phosphore (P) suggérant que les inclusions sont vraisemblablement des iAMC.C) De gauche à droite : (i) image de TEM-BF d'une iAMCMTB, (ii) cartographie chimique du Mg au niveau de l'inclusion, (iii) analyse de diffraction HR-TEM montrant l'absence de réseau cristallin et suggérant le caractère amorphe de l'inclusion.

Nous avons également mené une campagne d'échantillonnage à Beaulieu-sur-Dordogne, et nous avons prospecté différents sites de prélèvement dans les sédiments de la **rivière de la Dordogne**. Les premières observations en microscopie optique suggèrent la présence de plusieurs morphotypes de iACCMTB. Ces derniers présentant des similarités d'un point de vue de la motilité, l'ultrastructure cellulaire et la forme des inclusions avec les morphotypes 1 et 3 décrits au lac Pavin. Ces observations préliminaires nous indiquent la présence potentielle de MTB productrices d'iACC dans ce type d'environnement et suggèrent donc que le lac Pavin ne présente pas des conditions uniques pour la formation de carbonate mais que d'autres environnements aux propriétés très différentes peuvent également abriter de telles populations de MTB.

Les autres lacs explorés par notre équipe sont très oligotrophes (e.g. lac du Verdon) avec peu de débris organiques. L'analyse de leur sédiment ne nous ont pas montré la présence de MTB formant des inclusions qui ressemblent à des ACC ou des ABC.

5. Résumé des résultats principaux

La caractérisation géochimique de la colonne d'eau et des sédiments du lac Pavin suggère que les iAXCMTB occupent différentes niches écologiques en fonction de la nature des inclusions produites. Cependant, bien qu'il semble y avoir une stratification des iACCMTB et iABCMTB dans les sédiments, nous avons besoin de réaliser des analyses géochimiques plus précises du sédiment afin d'émettre des conclusions sur leur distribution respective.

Les explorations menées sur d'autres environnements aquatiques ont montré que les iAXCMTB sont répandues mais ne sont pas ubiquistes. L'analyse des conditions géochimiques de tous les environnements aquatiques dans lesquels sont rencontrées des populations de iAXCMTB permettra dans le futur de mettre en évidence les paramètres nécessaires au développement des iAXCMTB. Ces résultats montrent que des **lacs eutrophes anoxiques avec beaucoup de matière organique en décomposition sont des *hot spots* à iACCB**, ce qui suggère un lien étroit avec la minéralisation de la matière organique, donc la concentration en CH_4 et CO_2 qu'il faudrait mesurer systématiquement à l'avenir. Ces paramètres géochimiques seront un atout précieux pour comprendre les conditions requises pour la formation des iAXC mais aussi pour essayer de cultiver les iAXCMTB.

Chapitre IV: Recherche de souches cultivées formant des inclusions de carbonate de calcium

1. Contexte de l'étude

Les populations de iACCMTB représentent une diversité largement sous-estimée et pourraient offrir de nouveaux modèles de carbonatogénèse intracellulaire bactérienne. Néanmoins, il n'existe aucun modèle en culture à ce jour. Un tel modèle est pourtant nécessaire pour (i) étudier la cinétique de formation des inclusions de carbonates intracellulaires, (ii) déterminer leur rôle adaptatif et (iii), développer des outils omiques et génétiques pour en déterminer l'origine moléculaire. Elsa Turrini (IE dans l'équipe) a donc été recrutée en 2023 dans le cadre de l'ANR CarboMagnet pour isoler une iACCMTB en culture en élaborant des milieux de culture basés sur les analyses génomiques réalisées durant ma thèse.

Cette tâche étant risquée, nous avons aussi essayé d'obtenir une culture de *Pseudomonadota* produisant des iACC d'une autre manière. Nous avons émis l'hypothèse que la production d'iACC pouvait être un trait plus largement distribué aux seins des groupes taxonomiques auxquels les iACCMTB appartiennent, et que cette capacité était passée inaperçue chez certaines souches déjà cultivées non magnétotactiques. Ce court chapitre est donc consacré aux travaux préliminaires sur la recherche d'inclusions d'ACC chez des souches phylogénétiquement proches de iACCMTB, dont la sélection a été faite à partir d'une recherche bibliographique. J'ai analysé l'ultrastructure des cellules cultivées sur milieu riche solide, mais également celle de cellules cultivées dans une sélection de milieux développés par Elsa Turrini.

2. Bilan de la recherche bibliographique et sélection des souches types

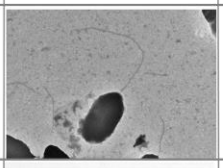
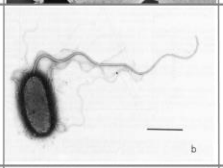
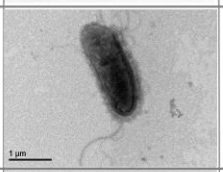
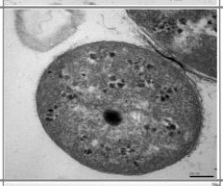
L'arbre phylogénétique des *Azospirillaceae* magnétotactiques construit à partir des séquences d'ADNr 16S a permis de mettre en évidence les genres cultivés les plus proches des bactéries d'intérêt (morphotype 1, 2 et 5 de iACCMTB) (**Figure 87**). Nous avons mené une recherche bibliographique complète sur l'ensemble de ces souches afin d'obtenir le maximum d'informations, dont : (1) la référence de l'article de caractérisation de la souche et son numéro d'accession dans les collections de culture, (2) l'ensemble des caractéristiques phénotypiques, (3) les images de microscopie optique, électronique et / ou des observations de coupes ultra-fines montrant l'ultrastructure, (4) le type d'habitat depuis lequel la souche a été isolée (e.g. eau de mer, lac d'eau douce, rivière, sédiment marin, sédiment lacustre, sol, air, rhizosphère), et (5), le métabolisme de la bactérie ainsi que le milieu et les conditions de culture ayant permis de l'isoler.

A partir de ces recherches, nous avons sélectionné 6 souches types montrant des inclusions denses au microscope électronique et / ou isolées de lac, de sol, de sable et de sédiment (**Tableau 7**) :

***Niveispirillum lacus* 1-14** (Cai et al., 2018)
***Niveispirillum irakense* DSM-11586** (Khammas et al., 1989)
***Niveispirillum fermenti* CC-LY736** (S.-Y. Lin et al., 2014)
***Indioceanicola profundi* SCSIO-08040** (Chen et al., 2018)
***Skermanella pratensis* W17** (Guo et al., 2020)
***Skermanella rosea* M1** (Subhash and Lee, 2016)

Cette liste est en cours de complétion avec d'autres souches du genre *Azospirillum* que je n'ai pas eu le temps de tester.

Tableau 7 : **Présentation des six souches types sélectionnées et testées pour la formation d'iACC.** Ces souches sont proches phylogénétiquement des iACCMTB affiliés à la famille des *Azospirillaceae*. Chacune de ces souches cultivées est associée à une image de microscopie électronique et le type d'habitat dans lequel elles ont été isolées. Les références des articles de caractérisation sont indiquées en rouge.

Nom de la souche	Image de microscopie électronique	Type d'habitat dans lequel les souches ont été isolées
Niveispirillum lacus 1-14		*(Cai et al., 2018)* Lac d'eau douce eutrophe Taihu (Jiangsu Province, China)
Niveispirillum irakense DSM-11586		*(Khammas et al., 1989)* Racines de riz (Orysa sativa) : rizières de la région de Diwaniyah (Qadisya) en Irak
Niveispirillum fermenti CC-LY736		*(Lin et al., 2014)* Cuve de fermentation située près d'une serre (Chung Hsing, Taichung)
Indioceanicola profundi SCSIO-08040		*(Chen et al., 2018)* Echantillon de sédiment en eau profonde (4461 m) et prélevé aseptiquement (Océan Indien)
Skermanella pratensis W17		*(Guo et al., 2020)* Echantillon de sol (Xinjiang, Chine)
Skermanella rosea M1		*(Subhash and Lee, 2016)* Sables désertiques contaminés par les hydrocarbures (Kuwait, Asia)

J'ai procédé à la même recherche pour l'ensemble de ces souches proches des iACCMTB de la classe des *Gammaproteobacteria,* qui pour rappel, appartiennent à deux ordres distincts. L'ordre *Canditatus* CAIRSR01 dans lequel on retrouve les iACCMTB du morphotype 3 ne contient aucune souche cultivée. En effet, la gammaprotéobactérie magnétotactique géante (GRS-1) n'avait été caractérisée que par des méthodes indépendantes de la culture. De même, les *Chromatiaceae* magnétotactiques formant des iACC (morphotype 4) sont proches du genre *Achromatium* dont aucun membre n'est à ce jour cultivable.

J'ai trouvé un ouvrage comparant le genre *Achromatium* aux genres *Macromonas*, *Thiobacterium*, *Thiospira*, et *Thiovulum* (**Figure 126**). Ces microorganismes ont fait l'objet d'une comparaison car (i) ils sont tous chimioautotrophes, (ii) ils semblent occuper le même type de niche écologique (i.e. les habitats naturels qui se caractérisent par la

présence simultanée de H_2S et d'O_2) et (iii), ils sont décrits comme sulfoxydants (La Rivière and Schmidt, 2006). La représentation schématique publiée dans cet ouvrage a suscité toute mon attention, à cause notamment de la ressemblance phénotypique évidente entre les cellules du genre *Macromonas* (i.e. *Macromonas bipunctata*, *Macromonas mobile*) et celles de certaines des $_{iACC}$MTB. Les auteurs de cet ouvrage suggèrent que les corps très réfringents de *Macromonas* sont composés de $CaCO_3$ à cause de leur ressemblance avec les inclusions d'*Achromatium*.

En menant des recherches supplémentaires sur le genre *Macromonas* appartenant à la classe des *Betaproteobacteria* (en cours de fusion avec la classe des *Gammaproteobacteria* dans la classification GTDB), j'ai constaté que plusieurs études ont suggéré cette hypothèse sans pour autant avoir de preuves formelles (Eprintsev et al., 2006; Matsuyama, 2004, 2002, 1992, 1991; Pizzorusso, 2021). L'équipe à l'origine de l'isolement de *Macromonas bipunctata* a même suggéré que ces inclusions étaient composées d'oxalate de calcium précisément (Grabovich et al., 1995; Dubinina et al., 2015). Une souche de ce genre est disponible en culture : ***Macromonas bipunctata* D405** DSM12705, isolée des sédiments d'un bassin d'aération des eaux usées par Dubinina et Grabovich en 1989. Cette souche a donc été ajoutée à la liste des souches à tester dans cette étude malgré son éloignement phylogénétique avec les espèces connues de $_{iACC}$B.

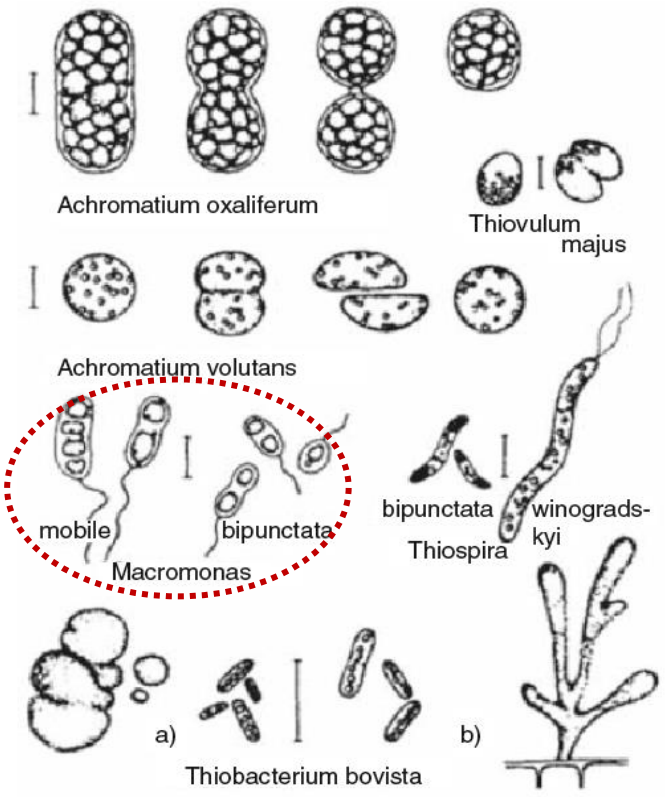


Figure 126 : **Représentation schématique des morphologies des bactéries sulfureuses des genres *Achromatium*, *Macromonas*, *Thiobacterium*, *Thiospira*, et *Thiovulum*.** Les barres d'échelles représentent 10 µm, sauf pour les colonies des espèces *Thiobacterium* (barres = 5 µm). **(La Rivière and Schmidt, 2006)**

2.1. Analyses préliminaires sur la recherche d'iACC chez les souches types

La réception des souches à l'institut s'accompagne d'un protocole pour leur culture, aussi donné dans l'article les ayant décrites. Toutes les souches commandées ont une croissance en hétérotrophie sur des milieux gélosés riches dont la composition est détaillée dans l'**Annexe 2**. De nouveaux stocks ont donc été réalisés à partir de cultures fraîches à l'aide d'agents cryoprotecteurs (glycérol et diméthylsulfoxyde DMSO) conservés à -80 °C. C'est à partir d'aliquots de ces stocks, que nous avons ensemencé (i) des géloses solides réalisées avec le milieu de base indiqué par le fournisseur (i.e. milieu riche hétérotrophe en aérobie), (ii) des géloses semi-solides du même milieu avec un gradient O_2/redox et (iii), des milieux semi-solides à gradient chimique inspirés des annotations fonctionnelles des génomes des $_{iACC}$MTB de la famille des *Azospirillaceae* (**Tableaux, Annexe 2**). Les milieux à gradient ont été testés dans l'hypothèse où les souches auraient besoin de conditions O_2/redox particulières pour former des inclusions de carbonates. Pour le dernier type de milieu, nous avons eu le temps de tester uniquement quelques voies de dégradation des sucres, et des composés en C1 (methylotrophie) en aérobie (i.e. glucose, méthanol et formate). Nous avons également ajouté du $NaHCO_3$ comme source de carbone inorganique. Un milieu semi-solide avec un gradient O_2/redox a été réalisé avec ces sources de carbone pour *N. lacus*, *N. irakense*, *N. fermenti*, *S. rosea*, *S. pratensis* et *M. bipunctata* (**Tableaux, Annexe 2**).

Les cultures en phase exponentielle et stationnaire de croissance ont été observées avec différentes techniques d'imagerie. Tout d'abord, des suspensions de cellules ont été observées au MO pour rechercher d'éventuelles inclusions réfringentes. Il s'agit d'un premier indicateur, car d'autres minéraux (e.g. granules de polyphosphates, PHA/PHB, soufre) peuvent l'être aussi. Puis, nous avons observé les cellules de ces cultures au MET afin de voir si des inclusions denses aux électrons étaient présentes dans les cellules. Des analyses de MEB-EDXS ont été réalisées à l'IMPMC pour valider ou infirmer la composition chimique des inclusions observées chez certaines souches.

Nous avons analysé un total de 7 souches parmi lesquelles deux ont été prometteuses sur la base de la réfringence sous le MO. En effet, les premières observations en microscopie MO des colonies de *Macromonas bipunctata* (en milieu MACROMONAS DSMZ 847 solide), et des colonies de *Skermanella pratensis* (en milieu TSA liquide et solide) ont montré la présence de bâtonnets de 3-4 µm de long dont la plupart étaient mobiles, non réceptifs au champ magnétique et dont le corps cellulaire était réfringent (**Figure 127**).

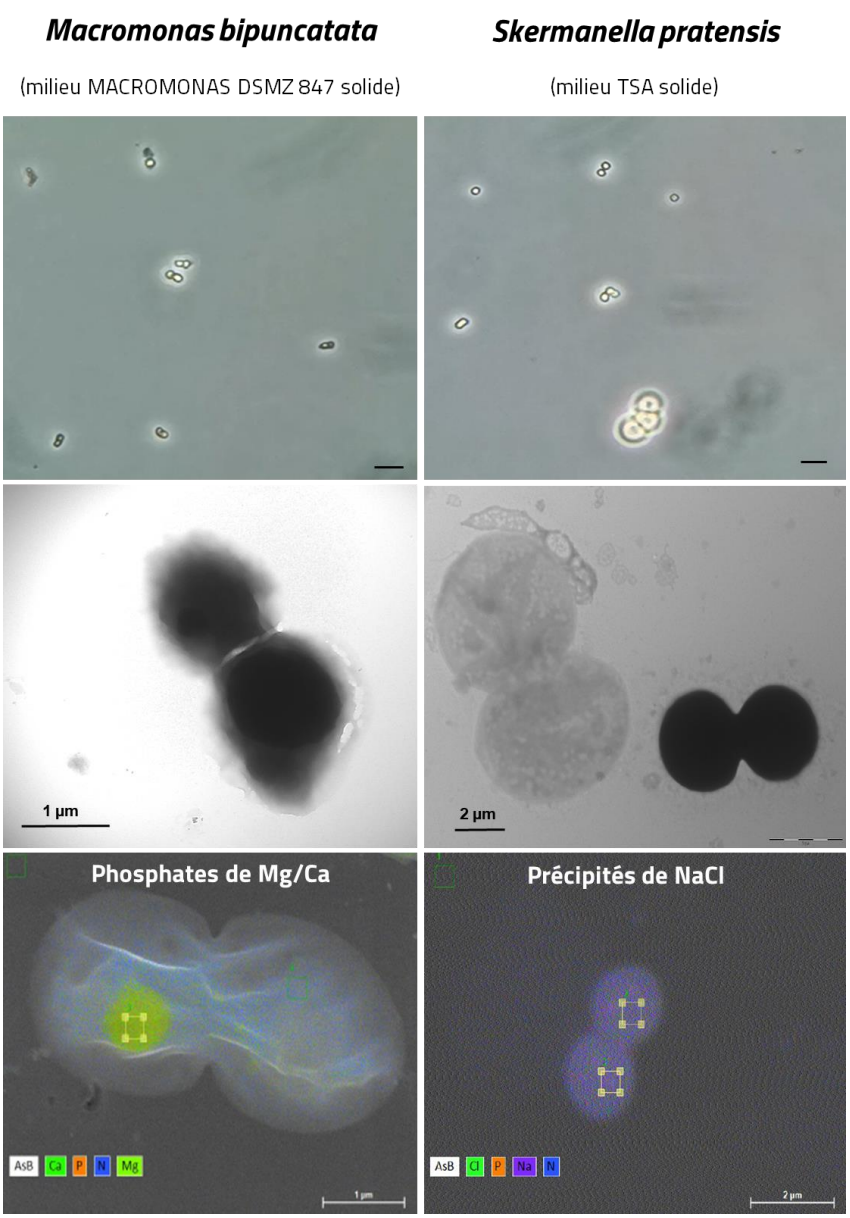


Figure 127 : Analyses microscopiques et spectroscopiques des souches *Macromonas bipunctata* (milieu solide) et *Skermanella pratensis* (milieu solide). La 1ère ligne correspond aux images de microscopie optique (MO) des cellules de colonies pour chacune des souches. La barre d'échelle en noir représente 4 µm. La 2ème ligne correspond aux images de MET pour chacune des souches. Les flèches blanches indiquent la présence de précipités agrégés plutôt que de bactéries. La 3ème ligne montre les analyses MEB-XEDS réalisées à l'IMPMC pour *M. bipuncata* et *S. pratensis* (milieu solide) par Arnaud Duverger.

Des grilles de microscopie électronique ont été préparées pour l'ensemble de ces deux souches afin de vérifier si elles formaient des inclusions denses aux électrons. Le corps cellulaire de *M. bipunctata* (en milieu solide DSMZ 847) et celui de *S. pratensis* (en milieu solide TSA) semblent avoir la particularité de pouvoir former des inclusions relativement denses aux électrons (**Figure 127**). Des grilles de ces deux souches ont donc été envoyées à l'IMPMC pour des analyses chimiques (MEB-EDXS). Les analyses ont montré que ***Macromonas bipuncata* forme des inclusions de polyphosphate enrichies en calcium et en magnésium** (en milieu MACROMONAS DSMZ 847 solide) (**Figure 127**). En

revanche, l'analyse chimique de *Skermanella pratensis* (en milieu TSA solide) n'a pas permis de détecter d'autres éléments que ceux présents dans les cellules sans inclusion.

Les cultures obtenues avec le glucose, le méthanol ou le formate comme seules sources de carbone organique n'ont pas montré de corps réfringents ou denses aux électrons (**Tableau 8**). *Macromonas bipunctata* n'a présenté de croissance dans aucune de ces conditions.

Aucune souche cultivée proche des $_{iACC}$MTB ne forme donc d'iACC. Cette étude devrait être étendue à l'ensemble des *Pseudomonadota* en testant d'autres milieux, notamment l'autotrophie avec l'hydrogène ou les composés soufrés réduits en donneur d'électrons.

Tableau 8 : **Conception de milieux de culture chimio-hétérotrophes en testant différentes sources de carbone organique (i.e. glucose, méthanol, formate) pour les souches *N. lacus*, *N. irakense*, *N. fermenti*, *S. rosea*, *S. pratensis* et *M. bipunctata*.** Après 6-7 jours d'ensemencement, les colonies sont observées au microscope optique et leurs observations sont répertoriées. Nous utilisons le symbole (+) pour quantifier l'abondance et la croissance des bactéries dans chaque milieu respectif.

Nom de la souche	**Différentes sources de carbone organique testées**		
	Glucose	**Méthanol**	**Formate**
N. lacus	• Croissance (+++) • Bâtonnets mobiles, de petite taille, **peu réfringents**	• Croissance (+) • Bâtonnets mobiles, de petite taille	• Croissance (+) • Bâtonnets mobiles, de petite taille
S. rosea	• Croissance (++) • Bâtonnets mobiles, de petite taille	• Croissance (+) • Bâtonnets mobiles, de petite taille	• Croissance (++) • Bâtonnets mobiles, de petite taille, **peu réfringents**
M. bipunctata	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance
S. pratensis	• Croissance (++) • Bâtonnets non mobiles, de petite taille	• Croissance (++) • Bâtonnets non mobiles, de petite taille	• Croissance (++) • Bâtonnets non mobiles, de petite taille
N. irakense	• Croissance (+++) • Bâtonnets mobiles, de petite taille	Pas de croissance	• Croissance (+) • Bâtonnets, non mobiles de petite taille, et quelques bâtonnets mobiles
N. fermenti	• Croissance (+++) • Bâtonnets mobiles, de petite taille	• Croissance (+) • Bâtonnets mobiles, de petite taille	• Croissance (+++) • Bâtonnets mobiles, de petite taille

Discussion générale

Cette section propose une discussion autour des résultats des différents chapitres, qui interprétés ensemble, permettent de mieux appréhender la diversité spécifique et fonctionnelle des iACCMTB et iACCB, mais également de comprendre certaines conditions environnementales de formation des iACC. Elle est organisée autour de grands questionnements sur la carbonatogenèse.

#1. La carbonatogenèse intracellulaire : une capacité répandue chez les bactéries ?

La découverte des iACCMTB dans les sédiments et de la colonne d'eau du lac Pavin en 2021 avait étendu notre vision de la diversité des bactéries capables de former des phases carbonatées intracellulaires. Plusieurs espèces d'*Azospirillaceae* (*Alphaproteobacteria*) venaient se rajouter à la liste des taxa d'iACCB dans laquelle figuraient le genre *Achromatium* (*Gammaproteobacteria*) et plusieurs familles de l'embranchement des *Cyanobacteria.* D'autres observations dans le même environnement ont suggéré qu'il existait plusieurs populations magnétotactiques avec des inclusions réfringentes, donc possiblement d'origine minérale. Durant ma thèse, j'ai donc mené une caractérisation plus approfondie des populations magnétotactiques formant des iACC (iACCMTB) dans le lac Pavin.

Cette étude a révélé l'existence de plusieurs populations de iAXCMTB mais également des iACCB avec des phases carbonatées de taille, de morphologie et de composition différentes qui n'avaient pas été observées auparavant. Cette diversité d'ultrastructure et de phases carbonatées a été systématiquement liée à différentes espèces / genres / familles et même ordres jamais décrits auparavant au sein des *Azospirillaceae* et des *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonadota*), ainsi que très probablement des *Thermodesulfobacteriota*. La seule analyse des communautés de MTB du lac Pavin essentiellement, mais également celle d'autres lacs et rivières, ont donc permis de montrer que la carbonatogenèse intracellulaire est une capacité répandue dans le domaine des *Bacteria.* Mais elle suggère également que d'autres espèces avec une telle capacité restent à découvrir dans d'autres clades de niveaux taxonomiques différents et d'autres localités. En effet, les arbres phylogénétiques reconstruits à partir de l'ADNr 16S ou des génomes pour chacune des classes de *Pseudomonadota* ont mis en évidence des populations proches des iACCMTB du lac Pavin qui forment, ou pourraient former également des iACC.

Ainsi, les iACCMTB du groupe des CAIRSR01 des *Gammaproteobacteria* sans nom ni statut officiel validé dans LPSN avaient été également observées il y a près de 10 ans sans que les inclusions de carbonates n'aient jamais été officiellement mentionnées ni caractérisées. En effet, Taoka *et al* (Taoka et al., 2014) observaient en 2014 une gammaprotéobactérie magnétotactique géante nommée GRS-1 formant des inclusions

riches en Ca et provenant d'un étang d'eau douce à Kanazawa, Japon. Cette bactérie représente une espèce très proche, voir surement la même, qu'une des espèces décrites au lac Pavin représentées par le génome CCP3-SC1AL1 et le morphotype 3. Les cellules du morphotype 3 de iACCMTB partagent de nombreux éléments d'ultrastructure avec la bactérie GRS-1. En effet, de manière similaire aux iACCMTB du lac Pavin, les cellules de GRS-1 mesurent ~13 µm de long sur ~8 µm de large, forment des inclusions de taille irrégulière entre 2,5 et 4,5 µm, synthétisent un nombre important de magnétosomes par cellule (i.e. a minima 300) en forme de prismes allongés, et nagent très lentement en suivant une trajectoire hélicoïdale par l'intermédiaire d'un faisceau de flagelles polaire (Taoka et al., 2014). En revanche, le morphotype 3 des iACCMTB se distingue des iACCB modèles du genre *Achromatium* par la taille. Par exemple, les cellules de type *Achromatium* du lac Pavin sont bien plus grandes (i.e. 22.3 ± 6.7 µm de longueur et 14.2 ± 4.0 de largeur) et forment des inclusions de taille bien plus homogène (3 ± 1,3 µm de diamètre) (Benzerara et al., 2021). Sur l'observation des seules données d'ultrastructure des populations de morphotype 3 de iACCMTB, de GRS-1 et d'*Achromatium*, nous pourrions prédire les relations de parentés sur la base des similarités des morphotypes. Les iACCMTB de morphotype 4 proches du genre *Achromatium*, pourraient également soutenir cette observation. Bien qu'elles soient bien plus petites, elles ont la particularité de former des petites inclusions sphériques et de taille régulière (~0,85 ± 0,16 µm). Certaines cyanobactéries ont également des inclusions de iACC d'une morphologie similaire, mais avec des tailles très irrégulières (~100 à 800 nm) (Benzerara et al., 2014). Au final, deux groupes de iACCB se distinguent donc très clairement chez les *Gammaproteobacteria* avec les iACCB de l'ordre CAIRSR01 et celui des *Chromatiales*.

A contrario, on ne peut pas prédire les relations de parentés entre *Azospirillaceae* formant des iACC simplement sur la base des similarités des morphotypes ou de leur proximité de niche ou géographie. Par exemple, la morphologie et l'ultrastructure des iACCMTB des morphotypes 2 et 5 sont très différentes, ainsi que leur habitat (i.e. la zone suboxique/anoxique des sédiments et de la colonne d'eau du lac Pavin, respectivement). Pourtant, ces iACCMTB appartiennent à deux genres qui partagent un ancêtre commun plus récent que celui que partagent les iACCMTB du morphotype 5 avec celles du morphotype 1, dont le morphotype est bien plus similaire. Par ailleurs, des arbres phylogénétiques préliminaires suggèrent que les iACCMTB du morphotype 5 sont même plus encore proches des iACCB de la zone oxique des sédiments à 20 m de profondeur qu'elles ne le sont des autres iACCMTB alors qu'elles ne partagent certainement pas la même niche. De manière intéressante, la forme et l'organisation des magnétosomes sembleraient être un meilleur indice de proximité génétique des espèces que celles des iACC.

Les arbres phylogénétiques basés sur les génomes nous ont donné d'autres informations très intéressantes et suggèrent l'existence d'autres iACCMTB dans d'autres habitats. En effet, les iACCMTB du lac Pavin forment deux groupes monophylétiques avec des génomes assemblés de métagénomes (MAGs) issus de la zone anoxique de la colonne d'eau de lacs

et étangs chimiquement stratifiés en Finlande, en Suède et au Canada (Buck et al., 2021). Une partie de ces génomes ont bien un cluster de gènes assemblé complet ou quasi complet qui code pour les magnétosomes, ce qui suggère que les MAGs appartiennent à des MTBs. Il est très possible que certaines portent également des iACC, mais aucune donnée de microscopie n'est disponible pour appuyer cette hypothèse. Il est intriguant que certains de ces MAGs de l'ordre CAIRSR01 des *Gammaproteobacteria* et du genre candidat BOG_933 des *Azospirillaceae* soient colocalisés dans les mêmes lacs comme les $_{iACC}$MTB du lac Pavin. Les gènes codant pour la formation de magnétosomes ne sont pas systématiquement recherchés dans les MAGs nouvellement publiés car cela ne fait pas forcément parti des objectifs de l'analyse. Mais il est possible que d'autres MAGs isolés d'environnements similaires au lac Pavin soient affiliés à d'autres clades et contiennent un MGC. Certains d'entre eux pourraient alors également former des iAXC.

L'avancée des technologies de séquençage ces dernières années a accéléré la caractérisation de nouveau biominéraux intracellulaires chez les bactéries. Les études du lac Pavin ne sont pas les seules à avoir mis en évidence des bactéries avec des phases carbonatées intracellulaires. En même temps que la première $_{iACC}$MTB était décrite et représentée par le génome CCP1, Liu *et al.* (Liu et al., 2021) mettaient également en évidence des populations de MTB formant des carbonates de Ca intracellulaires faiblement cristallins appartenant aux *Rhodospirillaceae*, une autre famille d'*Alphaproteobacteria* dans un autre lac d'eau douce Xingqinggong, ville de Xi'an, province de Shaanxi, Chine. Ces populations représentent encore un autre morphotype de $_{iACC}$MTB et étendent la diversité des $_{iACC}$B chez les *Alphaproteobacteria*. Elles ont une morphologie de spirille ou vibrion de longueur moyenne ~ 2,43 µm et de largeur ~0,84 µm, et forment 2 à 3 inclusions de $CaCO_3$ de plus petite taille (100,4 ± 21,4 nm) en comparaison avec les cellules des morphotypes 1, 2 et 5 de $_{iACC}$MTB. Si cette étude augmente encore notre vision de la distribution polyphylétique des $_{iACC}$B, elle montre aussi que nous pourrions être passés à côté d'autres espèces de $_{iACC}$B dans le passé. En effet, c'est la réfringence et la taille des iACC qui a attiré notre attention lors des observations au MO. Or les $_{iACC}$MTB observées par Liu *et al.* (Liu et al., 2021) n'ont pas de phénotypes distinctifs sous le MO par rapport aux autres spirilles ou vibrion magnétotactiques et les inclusions n'ont été observées qu' au MET. Cela suggère qu'il faudrait systématiquement utiliser les approches de EDXS couplées à la microscopie électronique pour identifier la nature chimique des inclusions contrastées souvent observées chez les MTB de l'environnement. C'est cette même approche qui avait permis d'identifier les granules intracellulaires sphériques de 270 ± 44 nm chez *Gloeomargarita lithophora* en 2012 (Couradeau et al., 2012). Mais elle présente des limites pour faire un scan rapide d'une communauté car elle est loin d'être une approche « haut débit ». L'utilisation de la microscopie Raman semble prometteuse pour cet objectif car elle permettrait d'identifier simultanément la structure physique du

matériau analysé ainsi que sa composition chimique élémentaire un peu plus rapidement, mais également de conclure sur le polymorphe du biominéral.

Tout comme pour la classe des *Gammaproteobacteria* et l'embranchement des *Cyanobacteria*, la diversité des $_{iACC}$B dans la classe des *Alphaproteobacteria,* semble donc être également représentée par plusieurs familles, et même des carbonates de composition différente. En effet, outre les *Rhodospirillaceae* et les *Azospirillaceae* mentionnées précédemment, les explorations des MTB du sédiment de Carry-le-Rouet en début de ma thèse ont révélé l'existence de $_{iAMC}$MTB, i.e. formant des carbonates de magnésium intracellulaires. Bien qu'une validation de leur identité n'ait pas encore été réalisée, les premières données de séquençage ont suggéré que les $_{iAMC}$MTB pourraient représenter une nouvelle famille basale aux *Azospirillaceae.* La caractérisation des groupes de $_{iABC}$MTB n'en est également qu'à ses prémices et pourtant permet déjà de confirmer qu'il existe plusieurs groupes de bactéries sulfato-réductrices dans le lac Pavin et le lac Aydat capables de former des phases carbonatées. La présence de magnétites en balles de fusil est un indicateur incontestable de l'affiliation de ces bactéries à des groupes ancestraux aux *Thermodesulfobacteriota* (Amor et al., 2020). Malgré une authentification toujours en cours, j'ai systématiquement obtenu des séquences similaires à plusieurs ordres de *Thermodesulfobacteriota,* ce qui validerait les interprétations sur la base des magnétites. La formation *in natura* de carbonates exclusivement associés au baryum chez les bactéries semblerait être la spécificité de ces groupes sulfatoréducteurs. En effet, bien que certaines *Cyanobacteria* comme *Gloeomargarita lithophora* accumulent également du baryum, d'autres éléments comme le strontium et le calcium sont également incorporés (Cam et al., 2016). L'ensemble des données de la littérature et de cette thèse montre que, tout comme la biominéralisation magnétique, la carbonatogenèse intracellulaire a une distribution polyphylétique chez les bactéries, et ce, à différents niveaux taxonomiques. L'exploration d'autres milieux aquatiques, mais également l'exploration des mêmes milieux aquatiques sans concentration magnétique, promettent la découverte de nouveaux phyla bactériens avec une telle capacité, mais également avec des carbonates de composition et structure différentes.

#2. Le carbone contenu dans les carbonates intracellulaires a-t-il une seule voie d'incorporation ?

Les $_{iACC}$B modèles du genre *Achromatium* et de l'embranchement des *Cyanobacteria* peuvent séquestrer le CO_2 sous forme de biomasse et de carbonate de calcium à partir du cycle de Calvin-Benson-Bassham. Les ions carbonates HCO_3^- sont d'abord importés puis convertis en CO_2 par des anhydrases carboniques dans le cytoplasme, qui est ensuite lui-même fixé par l'enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygénase (RuBisCO) (Coleman, 2000). Jusqu'ici la photoautotrophie et la chimioautotrophie étaient donc les seuls types trophiques associés à la carbonatogenèse intracellulaire. En effet, les 15% de complétude du génome de CCP1 n'avaient pas permis à Monteil et al., (2021) de

déterminer les voies d'incorporation du carbone organique et inorganique chez les *Azospirillaceae* magnétotactiques du lac Pavin. L'analyse des génomes de *Pseudomonadota* de cette étude a confirmé que tous les groupes des iACCMTB décrits ici auraient la capacité de fixer le carbone inorganique, mais possiblement à travers plusieurs voies.

Le cycle de CBB est une voie partagée par presque toutes les *Gammaproteobacteria* formant des iACC, mais certaines espèces comme *Candidatus* Achromatium palustre et celle représentée par CCP3-SC5AM1 pourraient également fixer le CO_2 par le cycle rTCA. De manière surprenante, le logiciel Pathway Tools prédit la voie réductrice de l'acétyl-CoA (voie de W-L) dans tous les génomes à l'exception des iACCB des *Chromatiaceae,* malgré un faible taux de complétude et l'absence de certains marqueurs. Cette voie permet de fixer le CO_2 avec l'H_2 comme agent réducteur pour former de l'acétyl-CoA chez certaines bactéries acétogènes. Il existe deux branches distinctes : la branche méthyle, qui utilise la voie du tétrahydrofolate, et la branche carbonyle, qui utilise la monoxyde de carbone déshydrogénase (Adam et al., 2018). La plupart des étapes de la réduction du CO_2 en méthyl-tétrahydrofolate (H_4folate) sont impliquées dans le métabolisme à un seul carbone chez presque tous les organismes, à l'exception de la réduction du CO_2 en formate et de l'activation du formate par la formyl-tétrahydrofolate synthétase (Fuchs, 2011). Les génomes d'*Azospirillaceae* des morphotypes 2 et 5 ainsi que tous les génomes de l'ordre CAIRSR01 des *Gammaproteobacteria* ont un ou plusieurs gènes codant pour la NADP-*dependent formate dehydrogenase*, une enzyme clé pour cette voie. Cette voie de fixation du CO_2 étant peu commune chez les bactéries de cet embranchement, il faut prendre ces résultats avec précaution et les valider avec une analyse plus approfondie des génomes mais également d'autres assemblages plus complets, ainsi que des cultures.

Très peu de gènes marqueurs fonctionnels utilisés dans le métabolisme du méthane et des composés carbonés en C1 ont été trouvés dans les génomes de iACCMTB. Seul le gène *mmoC* (méthane monooxygénase (MMO) composante C) a été détecté dans le génome du morphotype 2, suggérant que ce dernier pourrait être méthanotrophe. Toutefois, d'autres marqueurs importants comme *mmoX* (Tentori and Richardson, 2020), *pmoA*, codant pour la sous-unité bêta de la méthane mono-oxygénase particulaire, ainsi que le gène *fhcD*, liée à la méthanoptérine, intermédiaire réactionnel ou *mxaF* (methanol dehydrogenase gene) n'ont pas été détectés (Dumont, 2017). Les arguments pour la méthylotrophie et la méthanotrophie chez les iACCB *Alphaproteobacteria* sont donc encore minces, mais ne doivent pas être exclues prématurément car elles pourraient utiliser le formaldéhyde en conditions oxiques. De plus, ce type trophique a déjà été montré pour d'autres *Alphaproteobacteria* notamment chez les bactéries des genres *Methylosinus*, *Methyloceanibacter, Methyloligella, Paracoccus, Methylobacterium,* ou *Granulibacter* (Beck et al., 2015; Chistoserdova et al., 2009; Dziewit et al., 2015; Whittenbury et al., 1970). Certaines espèces d'*Azospirillaceae* comme *Rhodocista spp*. ou *Azospirillum* sont capables

d'utiliser de manière aérobie le méthanol, le formiate et la méthylamine comme sources de carbone (Do et al., 2007; Orlova et al., 2016).

En l'état, il apparaît donc que les iACCMTB puissent utiliser différentes voies de fixations du CO_2 et / ou composés en C1 en fonction de l'état rédox du milieu. En conditions oxiques ou micro-oxiques, les iACCMTB *Gammaproteobacteria* utiliseraient le cycle de CBB ou le cycle de Krebs inverse tandis que les iACCMTB *Alphaproteobacteria* utiliseraient la methylotrophie/methanotrophie. Il reste à déterminer si les *Gammaproteobacteria* utiliseraient ces mêmes voies en anoxie en utilisant les nitrates comme accepteur terminal d'électrons car elles possèdent toutes une voie de dénitrification incomplète, ou si comme les *Alphaproteobacteria* elles utiliseraient le CO_2 comme accepteur d'électrons et source de carbone à travers la voie WL. Cette dernière étant répandue chez les bactéries sulfato-réductrices, il est très possible qu'elle soit également à l'origine du carbone inorganique des iABC chez les *Thermodesulfobacteriota*.

#3. Les composés soufrés réduits et l'hydrogène moléculaire : des éléments clés de la biominéralisation des iACC chez les *Pseudomonadota* ?

Jusqu'ici, la littérature décrivait deux types trophiques associés à la production d'iACC : la photosynthèse chez les *Cyanobacteria* et la chimiolithoautotrophie chez *Achromatium* basé sur l'oxydation de composés soufrés réduits et la respiration d'oxygène ou des nitrates (Görgen et al., 2020; Cosmidis and Benzerara, 2022). Etant donné leur niche écologique, il était peu probable que les iACCMTB du lac Pavin utilisent la lumière comme source d'énergie : toutes les *Pseudomonadota* magnétotactiques ne sont ni pourpres ni vertes. Bien qu'elles peuvent utiliser des sources de carbone organique, elles peuvent également toutes fixer le CO_2 et possiblement des composés en C1 pour certaines. Mais toutes les iACCMTB ne réalisent pas cette fixation avec les mêmes donneurs et accepteurs terminaux d'électrons.

Notre étude montre que de manière générale, la carbonatogenèse intracellulaire est associée à la sulfoxydation chez toutes les *Gammaproteobacteria*. Ainsi, tous les ordres/espèces de *Gammaproteobacteria* formant des carbonates ont les voies d'oxydation du sulfure d'hydrogène et le complexe SOX permettant d'oxyder le thiosulfate. L'oxydation de ces composés pourrait aller de paire avec la réduction de l'O_2 ou des NO_3^- en nitrites tout comme chez *Achromatium* (Mansor et al., 2015; Salman et al., 2015). Chez *Achromatium oxaliferum*, on retrouve souvent des granules intracellulaires composés de soufre élémentaire (S^0) (Babenzien, 1991; Benzerara et al., 2021; Gray et al., 1997; I. M. Head et al., 2000; Ionescu et al., 2020; Mansor et al., 2015; Salman et al., 2015). Nous avons retrouvé certains marqueurs comme le gène *sgpB* dans le génome des iACCMTB qui suggèrent qu'elles biominéralisent également ces inclusions (Gregersen et al., 2011; Kümpel et al., 2023; Maki, 2013; Prange et al., 2004; Weissgerber et al., 2014), ce qui est

appuyé par mes observations de MO. En effet, il m'est arrivé d'observer des petites inclusions de petite taille et de contraste très différent des granules d'iACC, notamment chez les iACCMTB des morphotypes 3 et 4. Ces inclusions semblaient disparaitre très rapidement (i.e. au bout de quelques minutes d'observations) suggérant qu'elles étaient rapidement consommées par la bactérie ou très sensibles à l'oxygène. Cependant, nous avons eu l'occasion de valider la présence de soufre en EDXS notamment pour le morphotype 4. Les composés soufrés réduits, les nitrates et l'oxygène ne sont généralement pas colocalisés dans les sédiments (Whiticar, 2020) (cf. Chapitre III). Les bactéries vont chercher les donneurs d'électrons à des profondeurs où l'O_2 est absent. En absence d'O_2, elles peuvent utiliser les nitrates comme accepteur terminal d'électrons qui disparaissent pour laisser place à la zone de réduction des sulfates. La présence de granules de soufre est généralement le résultat d'une oxydation partielle des composés soufrés réduits, ce qui arrive lorsque les concentrations en NO_3^- sont limitantes (Cardoso et al., 2006) . Dans la colonne d'eau, nous avons observé que les nitrates sont épuisés avant le pic de MTB. Dans le sédiment cela semble également être le cas, mais les profils semblent hétérogènes en fonction de la saison.

La sulfoxydation n'est pas un métabolisme spécifique aux iACCMTB puisque d'autres *Gammaproteobacteria* magnétotactiques chimiolithoautotrophes marines comme *Ca*. Thiovirga magnetofrankelli SS-5 (Lefèvre et al., 2012) ou la souche de *Thiohalomonadales* BW-2 (Lefèvre et al., 2012) sont capables d'oxyder le thiosulfate ou le H_2S en condition microaérobie. Nous avons testé la formation de carbonates dans différentes conditions contrôlées chez ces souches, mais aucune d'entre elles ne formait de phases carbonatées (données non montrées). Ce n'est pas non plus un métabolisme spécifique des MTB puisque les souches cultivées non magnétotactiques les plus proches des iACCMTB du groupe CAIRSR01 sont également des bactéries sulfureuses comme *Beggiatoa leptomitoformis* (Dubinina et al., 2017) Le genre *Beggiatoa* forme un groupe monophylétique avec d'autres bactéries environnementales mais également des bactéries non sulfureuses génétiquement très éloignées appartenant aux genres *Methylohalomonas* et *Methylonatrum* capables de méthylotrophie mais également d'autotrophie par la voie CBB (Sorokin et al., 2007).

La fixation du carbone chez les iACCMTB appartenant aux *Alphaproteobacteria* n'implique pas le soufre ni l'azote en conditions oxiques. Même s'il manque les génomes de certains morphotypes d'*Alphaproteobacteria* pour représenter l'ensemble de la diversité des iACCMTB, les métabolismes des morphotypes 2 et 5 renvoient une image très similaire des métabolismes dans ce groupe d'iACCB. Les reconstructions soutiennent que la carbonatogenèse intracellulaire de ce groupe n'est pas associée à la sulfoxydation. De plus, aucune iACCMTB n'est une anammox pouvant fixer le CO_2 en oxydant l'ammonium en anaérobie en respirant les nitrates ou nitrites (Kuenen, 2008). Si la méthylotrophie était validée, la source de carbone pourrait être également la source d'électrons en conditions

oxiques et en conditions anoxiques puisqu'elles ont une voie de dénitrification partielle. Cependant, tout comme pour les *Gammaproteobacteria,* il est très possible qu'il existe une ou plusieurs voies alternatives impliquant l'hydrogène. En effet, au-delà des reconstructions métaboliques suggérant la voie de Wood-Lhungdahl chez les iACCMTB, de nombreuses hydrogénases type Hox ou/et Hdn montrent que l'hydrogène pourrait être un donneur d'électrons pour toutes les voies de fixation de carbone observées chez les iACCMTB. Plusieurs espèces proches auraient des métabolismes similaires. Par exemple, certaines *Azospirillaceae* sont autotrophes en utilisant la voie CBB, avec l'hydrogène comme donneur d'électrons en présence d'oxygène (Tilak et al., 1986).

La présence de gènes *hox* est intéressante ici car la [NiFe]-hydrogénase bidirectionnelle (Hox) liées au NAD(P) n'est présente que chez quelques bactéries notamment, certaines *Chromatiaceae* pourpres sulfureuses comme *Thiocapsa roseopersicina* et *Allochromatium vinosum* (Long et al., 2007; Maróti et al., 2010), et chez certaines cyanobactéries comme *Synechocystis* (Carrieri et al., 2011). Chez *T. roseopersicina*, l'hydrogénase Hox catalyse la production de H_2 dans l'obscurité, dans des conditions fermentaires et à la lumière en présence de thiosulfate, et fonctionne alternativement dans l'absorption de H_2 à la lumière en l'absence d'O_2 (Rákhely et al., 2007). C'est également un support de la fixation de CO_2 chez les *Cyanobacteria* dans n'importe quelles conditions redox mais uniquement dans le noir (Schütz et al., 2004). Est-ce qu'il est possible que les hydrogénases Hox fonctionnent de la même manière chez les MTB alors qu'elles ne sont vraisemblablement pas soumises à des cycles circadiens dans le sédiment ? Où ont elles évoluées à partir d'un ancêtre phototrophe pour n'assurer que l'absorption d'H_2 dans l'obscurité dans les lignées actuelles ? Les hydrogénases NADP-dépendantes pourraient soutenir la réduction du CO_2 en formate et *vice versa* à travers la voie de W-L chez toutes les iACCB sauf les *Chromatiaceae*. Mais encore une fois, une analyse plus poussée des génomes et des gènes est nécessaire pour valider ces observations. Si l'identité des iABCMTB était validée, il est fortement probable de trouver un lien entre cette voie de fixation du CO_2 basée sur l'oxydation de l'hydrogène et la formation de carbonates de baryum chez les SRB, car elle a déjà été trouvée chez d'autres MTB du même embranchement (i.e. *Thermodesulfobacteriota*) comme *Ca*. Magnetoglobus multicellularis (Adam et al., 2018).

#4. Les inclusions de carbonate peuvent-elles être définies comme des organites comme les magnétosomes ?

Les processus de compartimentation ou d'organellogenèse (de l'anglais *organellogenesis*), ont fait l'objet de peu d'attention chez les bactéries et les archées contrairement aux eucaryotes. Ceci est en partie dû à l'idée fausse que la formation des organites est une innovation unique de la cellule eucaryote considérée comme « complexe » contrairement aux cellules bactériennes et archéennes à tort décrites comme « simples » ou

« primitives » (Grant et al., 2018). Un organite est défini au sens large du terme comme « toute structure membranaire subcellulaire avec un contenu protéique défini qui fournit un environnement unique pour l'exécution et la séquestration des réactions biochimiques » (Cornejo et al., 2014). Sur la base de cette définition, les magnétosomes peuvent donc être considérés comme des organites, car ils répondent à tous ces critères (Grant et al., 2018). En effet, le magnétosome bactérien est (i) délimité par une bicouche lipidique, (ii) assure la fonction de magnétotaxie, et (iii) résulte de processus de biominéralisation complexes impliquant plusieurs étapes régulées génétiquement contrôlées par des protéines (Lower and Bazylinski, 2013). Mais est-ce également le cas pour les iACC ?

La présence d'une bicouche lipidique ou une monocouche de protéines est un argument fort pour définir un organite. Les analyses de MET de cellules préparées par ultramicrotomie conventionnelle et les analyses CEMOVIS avaient confirmé la présence d'une double membrane autour des iACC des *Azospirillaceae* magnétotactiques (Monteil et al., 2021). Il était difficile, voir impossible, de faire de telles analyses sur les autres morphotypes car elles demandent une biomasse importante. Après de nombreux essais, nous avons réussi à obtenir des images de coupes ultra-fines pour des *Gammaproteobacteria* de morphotype 3 (clade CAIRSR01) et certains *Thermodesulfobacteriota* formant des iABC. Tout comme les *Azospirillaceae,* elles ont révélé la présence de vésicules avec une double membrane, qui étant donné leur épaisseur, est très probablement de nature lipidique. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces observations et vérifier que cela ne soit pas un artefact de préparation. En effet, il y a presque 30 ans, des analyses similaires suggéraient une seule membrane lipidique chez *Achromatium oxaliferum* (Head et al., 1996). Cependant, les images ne sont pas assez résolues pour vraiment soutenir de telles conclusions ; les iACC d'*A. oxaliferum* pourraient également être entourés d'une double membrane. Des compartiments avec ces caractéristiques ont déjà été observés chez d'autres bactéries comme *Gemmata obscuriglobus*, dont le nucléoïde est séparé du reste du riboplasme par une double membrane (Lindsay et al., 2001).

S'il existait une seule bicouche lipidique autour des iACC, il serait facile d'imaginer des mécanismes de formation des vésicules similaires à ceux décrits chez les magnétosomes. Mais l'existence potentielle de deux couches soulève des questions, autant sur les mécanismes de formation que sur leur fonction. Existerait-il un mécanisme de formation indépendant de l'invagination de la membrane interne ? Ou bien un processus hybride impliquant d'abord une invagination de la membrane puis la formation d'une seconde couche autour des vésicules ? L'ultrastructure de ces inclusions contraste avec celle des *Cyanobacteria* chez qui une fine enveloppe dense aux électrons de ~2,5 nm a été systématiquement observée autour des granules d'ACC (Blondeau et al., 2018b). Cette épaisseur est similaire à celle de la coque protéique entourant les carboxysomes, ce qui pourrait indiquer que les iACC sont entourés d'une monocouche protéique ou d'une seule

couche de phospholipides. S'il est possible que les iACC des *Cyanobacteria* se forment à partir des carboxysomes (Blondeau et al., 2018b), ce n'est donc clairement pas le cas pour les autres $_{iACC}$B puisque aucune des espèces connues n'a les gènes nécessaires à leur formation. La formation des vésicules a donc probablement deux, voire trois, origines cellulaires et moléculaires différentes.

Dans tous les cas, les membranes créent un compartiment isolé du cytoplasme dans lequel la [Ca^{2+}], la [HCO_3^-] et le pH doivent être bien plus importants que celui dans le cytoplasme. En effet, une solution à pH neutre et donc sous-saturée en $CaCO_3$ représente des conditions environnementales thermodynamiquement défavorables à la précipitation minérale. De plus, les iACC sont généralement décrites comme des phases très instables (Addadi et al., 2003; Weiner et al., 2003). La présence d'une membrane entourant les iACC semble donc préserver leur intégrité et ce, dans des conditions extrêmes pour les $_{iACC}$MTB, ce qui est un argument fort en faveur de minéraux bien compartimentés. Les quelques tests préliminaires que j'ai réalisés en triplicas ont montré que les carbonates restent intègres dans le temps (0-8h) face à des conditions oxiques (données non montrées), et ne sont pas aussi sensibles à l'oxygène que ne le sont les granules de soufre. En effet, les $_{iACC}$MTB des deux classes de morphotype 1 et 3 du lac Pavin peuvent survivre et garder leur mobilité intacte pendant 8h dans l'eau du sédiment en présence d'oxygène. A partir de 8h et jusqu'à 10h, les inclusions n'ont commencé à se dissoudre que pour une minorité de MTB (10 %) alors que la mobilité a été très rapidement baissé. Peut être que le carbone inorganique n'est pas aussi rapidement consommé et que l'accumulation est indépendante des conditions redox, puisque nous avons également observé des $_{iACC}$B non magnétiques formant ces mêmes inclusions dans la zone oxygénée du sédiment profond. Si les carbonates étaient préservés après la mort de la cellule puis cristallisés, ils pourraient participer au registre sédimentaire. Il serait intéressant de définir le polymorphe et la signature des iACC cristallisés artificiellement pour les comparer aux phases carbonatées du sédiment.

L'ensemble de ces données soutient donc que la carbonatogenèse intracellulaire chez les $_{iACC}$MTB est un processus actif coûtant de l'énergie à la cellule. Le maintien d'un environnement intracellulaire sursaturé en ACC dans les inclusions devrait donc être probablement contrôlé génétiquement. Pour l'instant, nous n'avons pas fourni de preuves génomiques en ce sens. Le jeu de données est encore trop imparfait et de taille trop faible pour faire une étude de génomique comparée qui permettrait d'identifier des marqueurs et des architectures modulaires spécifiques à la formation des iACC comme pour les *Cyanobacteria* (Benzerara et al., 2022). Par contre, le gène de la calcyanine *ccyA* potentiellement impliquée dans l'homéostasie du Ca et des HCO_3^- n'a été retrouvé dans aucun génome de $_{iACC}$MTB.

Certaines pompes de type vacuolaire (V/A-type H+/Na+-transporting ATPases) ont été trouvées dans les génomes. Chez les eucaryotes, elles sont souvent associées aux membranes des organites (Finbow and Harrison, 1997). Chez *Achromatium sp.*, il existe une Ca^{2+}-ATPase de type V qui pourrait être liée à la translocation d'ions Ca^{2+} entre la membrane entourant le carbonate de calcium (Schorn et al., 2020). Nous avons bien retrouvé le gène associé, mais nous n'avons trouvé aucun homologue de cette ATPase en particulier dans les génomes de iACCMTB. Peut-être qu'il existe des équivalents fonctionnels parmi les autres ATPases détectées, mais un modèle en culture serait nécessaire pour déterminer leur colocalisation avec les membranes des iACC. Les pompes transportant des cations et les anhydrases carboniques sont potentiellement les seuls marqueurs qui pourraient être associés à la formation indépendamment de ceux formant les vésicules ou régulant leur agencement. En effet, il est peu probable de trouver des protéines contrôlant la croissance du cristal comme la sérine protéase MamE le fait pour la magnétite dans les magnétosomes (Wan et al., 2022a), ou comme les protéines glacogènes (INPs) le font pour nucléer le cristal de glace chez *Pseudomonas syringae* (Pandey et al., 2016). En effet, les structures amorphes sont plus vraisemblablement créées chimiquement, que par des protéines ordonnant les molécules.

Cependant, il est fortement probable qu'il existe des protéines spécifiquement dédiées au contrôle de la taille des vésicules, leur organisation et leur polarité, car nous avons mis en évidence des patterns réguliers pour tous les morphotypes. Les iACC sont peut-être agencées les unes aux autres grâce à des protéines *actin-like* similaires à MreB, MamK ou Mad28 (Uebe and Schüler, 2016). Enfin, certains membres de la famille ParA/MinD peuvent interagir avec d'autres molécules que l'ADN, et pourraient participer à la ségrégation et compartimentalisation de certaines protéines dans les organelles (Lutkenhaus, 2012). Nous en avons retrouvé plusieurs dans les clusters de gènes codant pour les magnétosomes des iACCMTB. Il existe également des protéines qui pourraient contrôler la transmission des organites lors de la fission binaire des bactéries, comme les protéines de type FtsZ (Margolin, 2005). Chez la MTB modèle *M. gryphiswaldense,* il existe des paralogues de FtsZ spécifiquement associés à la biominéralisation des magnétosomes (Müller et al., 2014). Enfin, la formation d'iACC pourrait être coexprimée avec un système à deux composants (TCS) spécifique, impliqué dans un chimiotactisme dirigé vers ou à l'opposé de gradients de CO_2 par exemple. C'est le cas pour la magnétotaxie qui implique de nombreux gènes *cheY* encodés dans le cluster MGC (Pfeiffer et al., 2020).

La petite hétérogénéité d'ultrastructures des cellules ou des minéraux au sein de chaque morphotype est surement associée à l'existence de plusieurs populations ou espèces génétiquement proches. Mais ces différences peuvent aussi être l'expression d'états physiologiques ou de stades de croissance et de division différents. L'observation régulière de certaines organisations soutient une certaine héritabilité des transmissions des iACC et des magnétosomes, et donc un contrôle génétique fin. Par exemple, nous avons

souvent observé des cellules du morphotype 1 formant 4 inclusions dont 2 de plus petite taille au centre tout comme Monteil et al., (2021). Des données moléculaires et de microscopie soutenaient le scénario selon laquelle deux granules se formaient au niveau du septum avant la fission binaire de la cellule mère en deux cellules filles (Monteil et al., 2021). Chez les *Alphaproteobacteria* de morphotype 1 et 5, les inclusions d'ACC des cellules filles semblent donc se former au niveau du septum de la cellule mère avant la fission binaire, ce qui n'est pas le cas des magnétosomes qui se forment généralement aux extrémités des chaines et après la division cellulaire. Les *Alphaproteobacteria* de morphotype 2, semblent suivre un autre schéma de formation de leur iACC. En effet, certaines des inclusions de petite taille, vraisemblablement en croissance, sont situées aux extrémités de la cellule. La formation et la transmission des iACC au cours du cycle cellulaire sont encore très méconnues pour l'ensemble des morphotypes et ne peuvent être élucidés sur la seule base de caractérisations environnementales.

Nous n'avons pas estimé le volume exact que représente les iAXC de chaque morphotype. Mais étant donné les rapports de tailles cellule/inclusions, ce volume s'approche certainement de ceux estimés pour *Achromatium spp.* et pour le morphotype 1 chez les *Pseudomonadota* décrites dans cette étude (i.e. 90 % et ~ 65% du volume microbien total (Benzerara et al., 2021; Monteil et al., 2021) respectivement)). Les inclusions des $_{iACC}$B des *Pseudomonadota* occupent donc un volume bien plus grand (i.e. d'un facteur ~ 10) en comparaison de celles des *Cyanobacteria* qui ne représentent qu'environ 6% du volume total des cellules (Couradeau et al., 2012). Un calcul approximatif du volume des cellules et de celui de leurs inclusions sphériques a permis d'estimer que le volume des carbonates de baryum représenterait un pourcentage équivalent chez les $_{iABC}$MTB (i.e. <10%) alors que les vacuoles possiblement d'origine lipidique (e.g. PHA) occuperaient la majorité de l'espace cellulaire dans la plupart des morphotypes. Quelle(s) serai(ent) la(les) fonctions putatives d'un stockage si massif d'iACC chez les *Pseudomonadota* ?

Les iACC peuvent contenir de grandes proportions de carbone et d'AEM Ces derniers n'étant pas limitants dans le lac Pavin, il est peu probable que les iACC représentent un stock de cations. Tous les génomes suggèrent plusieurs voies de fixation du carbone et des composés en C1, ces inclusions permettraient alors de stocker le carbone inorganique sous une forme hydratée et donc rapidement mobilisable (Cosmidis and Benzerara, 2022). Le carbonate dans l'inclusion est osmotiquement inactif alors qu'il serait actif dans le cytoplasme et surement toxique à ces concentrations. La fonction des iACC chez les procaryotes n'est pas bien comprise et peut différer entre $_{iACC}$B (Benzerara et al., 2014).
Salman et al. (Salman et al., 2015) émettaient l'hypothèse que les iACC pourraient maintenir l'équilibre du pH intracellulaire lors de la sulfoxydation chez les *Gammaproteobacteria*. L'important volume occupé par les iACC, particulièrement chez les *Pseudomonadota*, permettrait aussi de modifier la flottabilité des cellules et serait responsable d'un gravitropisme potentiellement important dans la mobilité des cellules.

Par analogie avec les magnétosomes, on peut facilement imaginer qu'une telle capacité peut faciliter la prospection des gradients chimiques verticaux. Les gradients chimiques dans les habitats aquatiques peuvent facilement être perturbés, la magnétoréception par la formation de carbonates pourraient alors conférer un avantage sélectif en guidant la bactérie verticalement indépendamment de la perception de l'environnement chimique local. Cette même hypothèse avait été proposée par plusieurs auteurs pour les sulfates de baryum intracellulaires qui pourraient jouer le rôle de statocystes chez plusieurs eucaryotes marins (Hemmersbach et al., 2005; Raven and Knoll, 2010). Par analogie et de manière très spéculative, on pourrait imaginer les ACC comme des statocystes bactériens dont le mouvement pourrait être perçu par des mécanorecepteurs positionnés entre les deux membranes. En effet, le vivant a développé certaines protéines sensibles à des stimuli mécaniques dans leur microenvironnement tels que la contrainte et la déformation, mais aussi la rigidité, la topologie et l'adhésivité d'un substrat (Chen et al., 2017).

D'autres compartiments chez les iABCMTB pourraient permettre la perception, ou du moins la mobilité gravité-dépendante de la même manière que celle induite par les minéraux. En effet, outre la formation de magnétosomes et des iAXC, des vacuoles géantes (i.e. représentant la majorité de l'espace cytoplasmique) ont été observées dans la majorité des morphotypes de iABCMTB. N'ayant absolument aucune densité aux électrons lors des observations au MET et aucun élément chimique différent de ceux du reste de la cellule ces vacuoles pourraient être gazeuses. Mais nous n'avons pas observé de tubules caractéristiques de vésicules gazeuses chez les archées et bactéries sur les coupes fines (Walsby, 1994). Si ces vacuoles étaient de nature lipidique, les ABCMTB pourraient s'en servir pour ajuster leur densité et donc leur flottabilité comme certaines algues unicellulaires en contrebalançant la forte densité des carbonates de baryum (Pilátová et al., 2022). Mais elles pourraient aussi contenir des acides polyhydroxyalcanoïques (PHA) comme les polyhydroxybutyrates (PHB), souvent formés à partir de l'organotrophie sous conditions stressantes (Tan et al., 2014). Il n'est pas rare d'en observer chez les MTB (Gorby et al., 1988; Su et al., 2023). Des gènes codant pour la synthèse des PHA (McCool and Cannon, 2001) ont été retrouvés dans plusieurs genomes de *Pseudomonadota* magnétotactiques. Les génomes en cours de séquençage permettront de valider la présence de ces gènes chez les iABCMTB.

#5. Différentes phases carbonatées : mécanismes d'incorporation des éléments alcalino-terreux sélectifs ou influence de l'environnement ?

La découverte des phases carbonatées de différentes compositions chimiques dans des embranchements différents soulève plusieurs questions sur les voies d'incorporation des AEM. En effet, plusieurs observations soutiennent à la fois l'existence de mécanismes biologiques sélectifs d'une part, et d'une influence de l'environnent d'autre part.

L'incorporation des AEM dans les différentes phases carbonatées pourrait d'abord être dépendante de la disponibilité des AEM présents dans l'environnement et certains paramètres environnementaux (e.g. % T°C, pH, ratios AEM) favorisant la séquestration d'un AEM à un autre. Or, des $_{iABC}$MTB et $_{iACC}$MTB ont été observés dans les mêmes sédiments dans lesquels le Ba et le Sr étaient donc limitants dans l'environnement par rapport au Ca et au Mg. En effet, nous avons observé de faibles concentrations de Ba et Sr dans le sédiment à 20 m du lac Pavin (< 0,1 µM et < 0,7 µM, respectivement) et de fortes concentrations de Ca (100-200 µM) sur toute la profondeur de la carotte. Si la composition des carbonates était dépendante de la disponibilité des AEM uniquement, alors nous aurions dû observer seulement des bactéries formant des iACC peu importe le taxon. En outre, nous aurions pu aussi observer des carbonates de magnésium ou de strontium puisque que le Mg et Sr sont plus concentrés que le Ba. Or nous avons montré que le Ba est préférentiellement incorporé dans les iABC et qu'il n'avait aucune trace de Ca, contrairement à certaines cyanobactéries qui vont incorporer différents AEM dans une même inclusion de carbonate.

Les carbonates intracellulaires formés par les cyanobactéries peuvent également contenir des proportions relativement élevées des AEM lourds tels que Sr ou Ba, pouvant indiquer l'existence d'un mécanisme de fractionnement favorisant l'absorption de ces éléments par rapport au Ca dans les biominéraux (Blondeau et al., 2018a; Cam et al., 2016; Mehta et al., 2019). Dans un milieu de culture concentré en Ca (250 µM) en Ba (250 µM), et faiblement en Sr (50 µM), la cyanobactérie *G. lithophora* accumule préférentiellement le Ba, puis le Sr et le Ca en dernier, tandis que *Cyanothece sp*. PCC7425 n'a pas montré une accumulation préférentielle de AEM plus lourds (Cam et al., 2016). Le fractionnement des AEM lourds incorporés de manière séquentielle dans les carbonates provoque une structure de noyau-coquille chez *G. lithophora*, qui n'a pas été observée chez *Cyanothece sp.* puisque celle-ci accumule d'abord le Ca. Cette capacité s'étend également aux AEM radioactifs tels que le radium (^{226}Ra) et le strontium (^{90}Sr), présents dans l'environnement à l'état de traces comparé au Ca dissous (très élevé) chez *G. lithophora* (Mehta et al., 2019). Il semblerait que l'environnement à lui seul ne suffit pas pour expliquer le fractionnement du Sr, Ba et du Ca chez les cyanobactéries; certains auteurs suggèrent même l'existence d'autres mécanismes uniques chez *G. lithophora* (Cam et al., 2015). Une absorption préférentielle de Sr et/ou Ba par rapport au Ca a également été observée chez l'algue verte *Closterium moniliferum* formant des biominéraux de $BaSO_4$ ou de $SrSO_4$ (Krejci et al., 2011) montrant une affinité des AEM lourds même avec du sulfate. Plusieurs espèces du genre *Tetraselmis spp.* d'eau douce et marine sont capables de biominéraliser des granules de iACC enrichis en Ca, Sr et Ba (Martignier et al., 2018, 2017). Les auteurs ont suggéré que la précipitation préférentielle du Sr ou du Ba chez ces microorganismes eucaryotes n'était pas opportuniste et dépendait du taxon (Martignier et al., 2017) tout comme chez *G. lithophora*.

L'exploration de la diversité des iABCMTB réalisée pendant cette thèse, a aussi révélé des bactéries sulfato-réductrices dans le même habitat qui renforcent l'idée que l'incorporation des AEM est sous un contrôle génétique. En effet, ces populations de morphologie plus ovoïde formaient des magnétosomes en forme de balle de fusil arrangés en une ou deux chaînes, et des inclusions globulaires ressemblant aux iABC mais composées de Ca. La forme des magnétosomes en balle de fusil suggère que ces bactéries appartiennent au phylum des *Thermodesulfobacteriota*. Deux bactéries avec potentiellement les mêmes métabolismes dans le même habitat pourraient donc incorporer sélectivement différents AEM et la séquestration préférentielle du Ca dans les carbonates n'est pas un trait spécifique aux *Pseudomonadota* et *Cyanobacteria*. Cette découverte soutient non seulement encore un peu plus l'idée qu'il existe une incorporation préférentielle des AEM par les bactéries, mais elle montre aussi que cette préférence n'est pas forcément associée à la masse de l'AEM comme chez les *Cyanobacteria*. L'accumulation de Ba et de Ca chez les *Thermodesulfobacteriota* et l'accumulation de Ca chez les *Alpha-* et *Gammaproteobacteria* suggèrent donc que les processus impliqués dans la formation de ces inclusions d'AXC sont actifs et différents selon le rang taxonomique. Mais cette spécificité est-elle liée à des transporteurs différents au niveau des inclusions ou est-ce plutôt la conséquence d'une physiologie de ces organismes et l'interaction avec des substrats différents ?

Comme décrit précédemment, il existe une protéine associée à la formation des iACC chez les cyanobactéries qui pourraient être impliquée dans l'homéostasie du Ca. La présence du gène *ccyA* codant pour cette protéine, la calcyanine, n'est pas liée à la formation de carbonates intracellulaires ni chez les morphotypes de iAXCMTB décrits au lac Pavin, ni d'*Achromatium*, montrant qu'il s'agit d'un marqueur spécifique à l'embranchement des *Cyanobacteria* (Benzerara et al., 2022). En revanche, nous ignorons à ce jour l'implication de ce gène dans l'incorporation sélective des AEM lourds (i.e. Ba, Sr, Ra) par rapport aux AEM plus légers (i.e. Ca, Mg). Des équivalents fonctionnels pourraient exister chez les iACCB non photosynthétiques, mais ils restent à être identifiés et validés (communication personnelle K. Benzerara).

Les différences de composition pourraient également être associées aux différents métabolismes. En effet, le Ba est un AEM présent à l'état de traces dans les roches magmatiques et sédimentaires. Mais on le retrouve également dans les plantes (Chaudhry et al., 1977). L'érosion des roches et la décomposition des plantes peuvent donc injecter du baryum dans les sédiments, dans lequels son temps de résidence est généralement court. En effet, le Ba s'oxydant très rapidement au contact de l'air, il est difficile de l'observer à l'état libre dans les environnements naturels (Ropp, 2013). Dans la nature, il se présente principalement sous la forme de minéraux peu solubles tels que la baryte ($BaSO_4$) (Dymond and Collier, 1996). La matière organique peut protéger sa dissolution, rallongeant ainsi son temps de résidence dans les sédiments (Light et al., 2023). Les sédiments riches en matière organique du lac Pavin notamment ceux que nous avons

échantillonnés à 20 m pourraient donc abriter des stocks de baryte, d'autant plus qu'ils sont peu brassés. Dans ces sédiments, la baryte pourrait servir de source de sulfate pour la respiration anaérobie de certaines bactéries sulfatoréductrices (Baldi et al., 1996), dont font parti les $_{iABC}$MTB. L'incorporation de la baryte dans les cellules pourrait générer beaucoup de Ba^{2+}. Or le baryum peut être toxique à certaines concentrations car il pourrait agir en tant qu'antagoniste de Ca^{2+} et K^{+} dans plusieurs réactions biochimiques (Baldi et al., 1996). Il est donc possible que les iABC ne soient finalement pas des stocks de carbone inorganique comme les iACC mais un moyen de détoxifier le cytoplasme du Ba^{2+} généré par la sulfatoréduction en hétérotrophie. Des mécanismes de détoxification similaires ont été proposés chez des bactéries symbiotiques du genre *Entotheonella,* formant des sulfates de baryum intracellulaires (Keren et al., 2017). Cette interprétation n'explique pas pourquoi d'autres *Thermodesulfobacteriota* formeraient des iACC par la même voie, à moins que justement, elles utilisent une voie alternative comme la voie de W-L pour fixer le carbone inorganique.

A ce jour, nous pensons au final qu'un contrôle génétique et environnemental est possible et différent en fonction du taxa et du microenvironnement des bactéries. Nous avons cependant besoin de nouvelles analyses géochimiques plus fines et sur différents environnements où les $_{iAXC}$MTB ont été retrouvées (e.g. lac Aydat et lac Pavin), ainsi que de modèles de *Pseudomonadota* et *Thermodesulfobacteriota* en culture pour tirer des conclusions. En effet, des cultures axéniques permettraient de quantifier le taux des AEM incorporés dans les carbonates en fonctions des conditions environnementales comme cela a été fait pour *G. lithophora*, *Cyanothece sp*. et *T. elongatus* (Cam et al., 2017). Mais elles permettraient également de développer des outils de génétique moléculaire pour tester les marqueurs candidats à l'homéostasie des AEM, et des ions HCO_3^-.

#6. La carbonatogenèse intracellulaire est-elle un mécanisme ancien ? Quelle est son histoire évolutive ?

Il est actuellement encore très difficile de dater l'émergence de la formation des AXB étant donné le peu de connaissances sur la distribution de ce trait dans les autres embranchements bactériens. L'existence de nombreuses espèces de $_{iACC}$B dans des phyla ancestraux serait un argument pour dater une ou plusieurs origines anciennes. Mais la formation des carbonates est elle compatible avec les conditions biogéochimiques primitives ?

Les systèmes hydrothermaux en eaux profondes associés à la serpentinisation des roches ultramafiques sont considérés comme l'un des environnements les plus plausibles pour l'apparition de la vie, tant d'un point de vue biologique que géologique (Kitadai et al., 2018; McCollom, 2016; Popall et al., 2023). Les fluides sont souvent enrichis en CH_4, en H_2 et en petites molécules d'origine abiotique, notamment, le monoxyde de carbone (CO) qui peut également être produit de l'électro-réduction du CO_2 d'origine mantellique à partir de certains sulfures métalliques (par exemple, CdS et Ag_2S) (Kitadai et al., 2018).

Ces réactions favorables pouvaient être à l'origine de la synthèse organique abiotique décrite par Wächtershäuser (cf. review de Nakashima *et al.* (Nakashima et al., 2018)). Ces systèmes créent des conditions hyperalcalines qui convertissent la plus grande partie du carbone inorganique dissous (DIC) de l'environnement en carbonates (Popall et al., 2023). On attend donc que de tels systèmes soient peu favorables à la fixation du CO_2 en carbonates intracellulaires. Cependant, des petites molécules en C1 peuvent être oxydées en CO_2 par des anhydrases carboniques ou des déshydrogénases spécifiques. Former des iAXC pourrait avoir constitué une première forme de stockage et être une réponse adaptative à des conditions limitantes en CO_2. En effet, le carbonate peut-être converti en CO_2 pour ensuite être introduit dans différentes voies de fixation du carbone produisant de l'acétyl-CoA comme la voie de W-L, le cycle rTCA et le cycle CBB, que nous avons détecté dans les génomes de $_{iACC}$MTB. Toutes ces voies de fixation ont par ailleurs été trouvées chez des bactéries des systèmes serpentinisés (Seyler et al., 2020) actuels, pouvant utiliser différentes chaines respiratoires en fonction de la partie des cheminées. Cependant, il est possible que le CO_2 ait été un des seuls accepteurs d'électrons et l'hydrogène un des seuls donneurs d'électrons possibles dans des systèmes primitifs en absence d'oxygène et de grosses molécules organiques (Buckel and Thauer, 2018). Cela fait de la voie W-L un des premiers métabolismes candidats à la chimioautotrophie (Braakman and Smith, 2012). Une chaine respiratoire, voie impliquant le Rnf complexe dans laquelle les ions H^+ seraient l'accepteur terminal d'électron pourrait aussi être importante (Buckel and Thauer, 2018).

La carbonatogenèse intracellulaire a bien une distribution polyphylétique à plusieurs niveaux taxonomiques, et la découverte de iAXC chez les *Thermodesulfobacteriota* pourrait écrire un chapitre supplémentaire après la découverte des iACC chez la *Gammaproteobacteria* géante (Schewiakoff W, 1893), la cyanobactérie *Gloeomargarita* (Couradeau et al., 2012) et *l'Alphaproteobacteria* magnétotactique (Monteil et al., 2021). Le fait que toutes les $_{iACC}$B n'aient pas un ancêtre commun direct soulève des interrogations sur les voies de diversification de manière similaire à la magnétotaxie.

Plus de 40 ans d'étude d'écologie microbienne ont mis en évidence des MTB dans plus de 15 embranchements bactériens (Goswami et al., 2022), dont toutes semblent partager le même déterminisme moléculaire. Plusieurs hypothèses sont formulées pour comprendre une telle distribution mêlant des événements de transferts horizontaux multiples et des duplications, mais aussi par des transmissions verticales suivis d'évènements de perte chez les ancêtres de phyla non magnétotactiques (Amor et al., 2020). L'histoire de la diversification des $_{iAXC}$B pourrait avoir été générée par les mêmes évènements évolutifs que ceux des MTB. Cependant, avec cette étude, de plus en plus d'évidences soutiennent que la formation de iAXC n'a pas une seule origine comme pour les magnétosomes, mais au moins deux ; une chez les *Granilicutes* et une chez les *Terrabacteria* (Coleman et al., 2021). En effet, il est peu probable que le même

déterminisme moléculaire et la même physiologie soient responsables de la formation de iAXC et d'ultrastructures aussi contrastées chez les *Thermodesulfobacteriota*, les *Pseudomonadota* et les *Cyanobacteria*. L'organellogenèse implique des processus très différents si les membranes sont faites de protéines, de lipides en monocouche ou bicouche. D'autre part, les $_{iAXC}$B ont des types trophiques distincts bien que tous impliqueraient des voies de fixation du CO_2. Et bien qu'on ne connaisse pas encore de marqueurs spécifiques à la formation des iAXC chez les *Pseudomonadota*, l'absence de marqueurs clés cyanobactériens de l'homéostasie du Ca et du HCO_3^- comme la calcyanine, montre que d'autres gènes sont impliqués dans la même fonction dans ce groupe. Une fois une base génétique spécifique identifiée, la comparaison d'arbres phylogénétiques pourra permettre de tester si des évènements de transferts horizontaux ont eu lieu entre $_{iACC}$B au sein du même embranchement et de dater l'acquisition de cette capacité. S'il y a plusieurs origines, il reste alors aussi à déterminer si l'évolution de la carbonatogenèse intracellulaire est, ou n'est pas, un cas d'évolution convergente. On parle d'évolution convergente d'un caractère si celui ci n'est pas hérité d'un ancêtre commun, mais assure la même fonction (Gabora, 2013). Dans le cas des iAXC, il reste toujours à définir cette fonction : est-ce qu'elle représente la même adaptation répondant à une même pression de sélection ? La réponse n'est surement pas binaire. Comme les magnétosomes, il existe certainement plusieurs rôles avec des adaptations primaires et d'autres secondaires (Lin et al., 2017). Dans un cas comme dans l'autre les organites ont surement un rôle dans la bioénergétique cellulaire. Si l'inclusion d'AXC est bien une réserve de carbone inorganique, alors oui, l'évolution des ACC est très probablement un cas d'évolution convergente.

L'histoire évolutive des $_{iACC}$B n'est pas liée à celle des MTB et *vice versa* ; il existe des MTB sans iACC comme il existe des $_{iACC}$B sans magnétosomes dans les mêmes familles. Les formations des deux organites ne semblent donc pas être liées ni d'un point de vue évolutif ni d'un point de vue physiologique, même si on ne comprend pas encore bien à quoi peut servir les magnétosomes d'un point de vue de l'énergétique cellulaire. De même, si la présence des carbonates est dépendante des voies de fixation du CO_2 précédemment citées, l'inverse n'est pas vrai. Les phylogénies reconstruites pour chaque classe de *Pseudomonadota* suggèrent que la fixation du CO_2 pourrait être une adaptation à tous les milieux chimiquement stratifiés et/ou riches en méthane et que la capacité à former des iACC a été héritée d'un ancêtre commun pour chaque groupe. En effet, les métabolismes au sein des groupes monophylétiques formés par des $_{iACC}$B et les bactéries de lacs stratifiés d'eau douce sont très similaires, voir identiques. Certains sont vraisemblablement magnétotactiques. Les quelques autres génomes isolés de permafrost ou de sources hydrothermales ont également des capacités à séquestrer le CO_2 à travers des voies supplémentaires comme par la synthèse anaplérotique d'oxaloacétate, ou à oxyder le méthane.

#7. La carbonatogenèse intracellulaire : une spécificité de certains environnements aquatiques chimiquement stratifiés ? Quels liens entre iAXCB et cycles biogéochimiques ?

La boucle microbienne et les conditions géochimiques du lac Pavin ne reproduisent pas le même écosystème que celui des systèmes serpentinisés dont on a parlé précédemment. Mais ils reposent tous les deux sur les cycles du CO_2 et du CH_4 (Biderre-Petit et al., 2019; Popall et al., 2023). Les sédiments de lacs volcaniques méromictiques sont décrits comme des réservoirs de CO_2 et de CH_4, en particulier ceux qui présentent une morphologie d'entonnoir et qui reçoivent des apports de CO_2 d'origine mantellique (Jézéquel et al., 2016; Tassi et al., 2018). Bien que la méthanogenèse participe à cette production au niveau du monimolimnion, la concentration de CH_4 dans les lacs volcaniques méromictiques serait due au flux de CH_4 provenant principalement du compartiment sédimentaire (Lopes et al., 2011). De fortes teneurs en gaz dissous sont donc piégées dans le sédiment mais également dans la colonne d'eau. Le relais entre les activités de différents organismes méthanogènes, méthanotrophes, méthylotrophes puis autotrophes créé des gradients de CH_4, de composés carbonés en C1, et de CO_2 dans la colonne d'eau corrélés avec les gradients de sulfure d'hydrogène, de sulfate, de nitrate et d'oxygène (Berg et al., 2019; Bidaud et al., 2022; Biderre-Petit et al., 2019, 2011; Jaffe et al., 2023; Jézéquel et al., 2016; Lehours et al., 2005; Tassi et al., 2018).

Généralement dans les environnements stratifiés, en l'absence d'oxygène, le CH_4 peut être oxydé séquentiellement par la réduction des sulfates, mais également des nitrates ou des nitrites qui jouent le rôle d'accepteurs terminaux d'électrons (Deutzmann and Schink, 2011; Nie et al., 2021; Van Grinsven et al., 2020). Dans le lac Pavin, l'oxydation anaérobie du CH_4 pourrait se réaliser dans la redoxcline/chemocline des sédiments du mixolimnion et celle de la colonne d'eau dans lesquelles on retrouve les MTB. Les organismes méthylotrophes et méthanotrophes retrouvés dans la redoxcline/chemocline de la colonne d'eau (Biderre-Petit et al., 2011, 2019; Borrel et al., 2012; Lehours et al., 2005, 2007, 2016), pourraient donc générer du CO_2 et des composés en C1 et d'autres petites molécules organiques disponibles. Nous avons mis en évidence des concentrations relativement importantes de DIC dans le sédiment du lac Pavin. En effet, les profils de DIC dans les carottes de sédiment à 20 m montrent des concentrations en C inorganique (~11-16 mg/L) qui augmentent avec la profondeur. Nous attendons que les analyses en cours montrent également cette même gamme de valeurs pour la colonne d'eau. En effet, en général, la concentration est faible dans le mixolimnion (i.e. 0,5 mM) pour augmenter exponentiellement sous l'OATZ et atteindre des concentrations >10mM dans la gamme de profondeurs dans laquelle on retrouve le maximum de MTB (Jézéquel et al., 2016). Le DIC constituerait donc une source de carbone abondante, disponible et utilisable notamment pour les MTB et iACCB dans toutes les zones suboxiques de la colonne d'eau et du sédiment.

C'est au niveau de cette zone particulière que Biderre-Petit et al., (2019) ont observé la plus grande richesse d'espèces bactériennes. Cette richesse s'explique par l'existence de niches écologiques variées associées à la présence de plusieurs gradients chimiques avec des espèces oxydées et réduites. Cette couche abrite encore quelques archées méthanogènes affiliées aux *Methanomicrobiales*, et des bactéries appartenant aux *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* et *Verrucomicrobia*. Mais plus de trois quarts des taxa étaient des *Pseudomonadota* (anciens *Proteobacteria*), embranchement à laquelle appartiennent les MTBc et les iACCMTB *Azospirillaceae* du morphotype 5. On ne connaît pas encore la composition taxonomique exacte des communautés microbiennes auxquelles appartiennent les MTB autant au niveau de la colonne d'eau que des sédiments, et donc *in extenso* les possibles relations syntrophiques. Il faudrait spécifiquement obtenir un métagénome sur la couche de 20 cm, correspondante au pic de MTB.

En réalité, l'étude de la colonne d'eau suggère qu'il existe vraisemblablement plusieurs niches de MTB qui semblent parfois être colocalisées à la même profondeur en fonction de la saison. En automne, les optimums d'abondances des populations de MTB dominantes, c'est-à-dire les MTBc et les iACCMTB, sont localisées à des profondeurs séparées de quelques dizaines de centimètres alors qu'ils se confondent en été. Ce profilage avec une résolution de 20 cm suggère que les deux populations sont sensibles à des gradients légèrement différents qui doivent surement varier avec les saisons. Par exemple, il existe des variations saisonnières au niveau de l'oxydation du methane d'origine aérobie et anaérobie, mais également de l'intensité des flux de CH_4 vers les couches supérieures du mixolimnion (Lopes et al., 2011). De telles variations, couplées aux brassages saisonniers pourraient engendrer des décalages au niveau de tous les composés importants pour la croissance des différentes populations de MTB.

Si les flux de carbone variaient, alors les carbonates pourraient être des pièges/réserves à carbone inorganique pour les iACCMTB leur permettant de palier à ces variations. Mais à ce moment là, pourquoi les MTBc ne forment-elles pas d'iACC tout comme les iACCMTB ? En effet, des génomes de MTBc de la colonne d'eau non publiés suggèrent que ces populations fixent aussi le CO_2 par la voie du cycle de Krebs inverse et sont sulfoxydantes. Donc si l'iACC sert de stock de carbone et de tampon à l'acidification du pH intracellulaire, les MTBc auraient un avantage à former de tels minéraux. Inversement, les iACCMTB de la colonne d'eau n'auraient pas besoin de ces minéraux pour réguler le pH puisqu'elles ne sont pas sulfoxydantes. Il y a une autre incohérence : il serait logique de former des pièges à carbone dans des environnements limitants en Ci. Or cette source ne semble pas limitante dans le lac Pavin comme elle le serait dans les systèmes serpentinisés. Les différences de niches entre MTBc et iACCMTB seraient elles alors liées à la méthylotrophie et l'utilisation de différents donneurs d'électrons ?

Il serait intéressant de savoir s'il existe des états physiologiques durant lesquels les iACCMTB ne forment pas d'iACC. Pour l'instant, nous n'avons jamais identifié de telles populations dans la colonne d'eau, suggérant que les iACC sont présents durant tout le cycle de vie de la bactérie. La faible corrélation entre la concentration en calcium particulaire et la concentration en iACCMTB suggère à la fois que les iACCMTB sont des contributeurs importants de ce pool mais qu'ils ne sont pas les seuls (Bidaud et al., 2022). Inversement, nous ne connaissons pas encore la fraction relative des communautés benthiques et pélagiques représentées par les iACCB non magnétotactiques comme les *Azospirillaceae spp.* que nous avons observés durant l'exploration de la zone oxique des sédiments profonds (20 m) du mixolimnion, ou comme les *Achromatium spp.* observées par Benzerara et al., (2021). Ces données sont pourtant essentielles si on veut quantifier la contribution des iACCB dans les cycles biogéochimiques en tant que réservoir ou participant aux processus de transport et de transformation des éléments.

Les résultats indiquent que les lacs chimiquement stratifiés présentant une zone anoxique avec beaucoup de matière organique en décomposition ou les lacs eutrophes avec peu de brassage des eaux, seraient des *hot spots* à iACCB non photosynthétiques, car ils favorisent la minéralisation de la matière organique, et donc la production de CH_4 et CO_2. C'est surement ce qui structure également les populations de iACCB non photosynthétiques dans les autres milieux aquatiques. En effet, tous les lacs d'eau douce, environnements marins, rivières ou zones humides, dans lesquels ils ont été observés dans cette étude ou dans d'autres (Benzerara et al., 2021; Salman et al., 2016; Taoka et al., 2014), étaient localement riches en matière organique et peu perturbés. Par exemple, l'alphaprotéobactérie formant des nano-inclusions de $CaCO_3$ provient de sédiments de surface du lac Xingqing de la région Xi'an, Chine (Liu et al., 2021), dont les lacs sont décrits comme très riches en matière organique en décomposition (Chen et al., 2023). Les iACCB de type *Achromatium* ont été observées à la fois dans les sédiments marins (Lackey and Lackey, 1961; Salman et al., 2016, 2015) et dans les sédiments d'eau douce (Babenzien, 1991; Babenzien and Sass, 1996; Gray et al., 1999b; I. Head et al., 2000; Head et al., 1996; Schewiakoff W, 1893). Ces environnements contrastent donc avec les sédiments des rivières et les environnements côtiers qui sont souvent soumis aux courants avec peu de dépôts végétaux. Ces derniers ne sont pas favorables à la mise en place d'une boucle microbienne impliquant le CH_4, ce qui pourrait expliquer que peu de microbiologistes aient observé des iACCB auparavant.

D'autres espèces chimiques contrôlent indirectement le pool de iACCB non photosynthétiques. Le fer par exemple, est surement un élément important puisqu'il est essentiel à la formation des magnétosomes chez les iAXCMTB. Cependant, ces derniers représentent peut-être une petite fraction des communautés de iAXCB et de bactéries totales. Cette donnée n'a pas été proprement quantifiée dans les sédiments du lac Pavin,

mais Bidaud et al. (Bidaud et al., 2022) estimaient que les MTB représentaient 1 bactérie pour 1000. Le soufre semble particulièrement important puisque les bactéries sulfoxydantes et sulfatoréductrices pourraient représenter 10% des iACCMTB du sédiment superficiel au niveau des berges du lac Pavin et jusqu'à plus de 90% dans les couches profondes du sédiment à 20 m de profondeur. Cela est confirmé dans d'autres environnements réduits faiblement oxygénés et riches en sulfures dans lesquels *Achromatium* oxydent les composés soufrés réduits en sulfate (Gray et al., 1999a, 1997; I. M. Head et al., 2000).

Nous avons observé une plus grande diversité spécifique de iAXCB dans le sédiment en comparaison avec la colonne d'eau. Cette différence peut être expliquée par la diversité des niches biogéochimiques, la disponibilité de certains substrats ou la structure de l'OATZ. Par exemple, les iABCMTB pourraient ne pas seulement être des sulfatoréductrices, mais également des bactéries fermentaires. Cela pourrait peut-être expliquer qu'on ne les trouve pas dans la colonne d'eau puisque les sucres y seraient limitants. Il n'est cependant pas clair pourquoi on ne retrouve pas des iACCMTB affiliées aux *Gammaproteobacteria* dans la colonne d'eau (Biderre-Petit et al., 2019). Pour l'instant, nous l'expliquons par des différences de mobilité. En effet, les cellules appartenant au morphotype 3 sont lourdes et se déplacent lentement. Or, l'épaisseur de l'OATZ dans le sédiment est beaucoup plus faible (~ premiers millimètres) en comparaison avec celle de la colonne d'eau (~ plusieurs mètres), avec des gradients chimiques qui ne diffusent pas sur la même échelle d'espace. Il serait donc plus simple et moins énergivore pour les bactéries portant des grosses inclusions de carbonates de se déplacer sur de plus faibles distances.

Les niches des iACCB, appartenant à trois embranchements, sont différentes. L'ensemble des éléments ne devraient donc pas contribuer de la même manière à la formation de leurs carbonates intracellulaires. Si tous participent au cycle du carbone dans des proportions qui restent à quantifier, il est certain que leurs types trophiques leur permettent de contribuer différemment aux cycles des autres éléments chimiques. Les cyanobactéries *Gloeomargarita lithophora* et *Candidatus* Synechococcus calcipolaris G9 formant des iACC ont été isolées de microbialites provenant d'un lac hyperalcalin (lac Alchichica) au Mexique (pH ~ 8.9, T° ~19 °C, HCO_3 ~43 mM) (Benzerara et al., 2014; Couradeau et al., 2012; Moreira et al., 2016). Ces microbialites sont majoritairement composées d'hydromagnésite et d'aragonite ($CaCO_3$) (Couradeau et al., 2012) et sont avant tout des structures organosédimentaires (Couradeau et al., 2011). Alchichica est un lac stratifié pendant la majeure partie de l'année car les eaux de surface oxygénées se mélangent aux eaux anoxiques profondes uniquement pendant l'hiver (Macek et al., 2008). Bien qu'il soit décrit comme oligotrophe, le lac Alchichica peut accumuler et séquestrer d'importantes quantités de carbone organique dans les eaux profondes, notamment dans le sédiment superficiel, ce qui peut émettre de larges quantités de CO_2 (Alcocer et al., 2014). C'est peut-être ce flux de CO_2 qui explique la formation des iACC par

les cyanobactéries isolées d'autres environnements notamment les rizières et des sources d'eaux chaudes au Japon (Benzerara et al., 2014). Nous n'avons pas encore d'informations sur le métabolisme des *Azospirillaceae* non magnétotactiques observées à la surface des sédiments et qui sont exposées à la lumière. Mais certaines *Gammaproteobacteria* et *Alphaproteobacteria* dans les familles des iACCB étant capables de photosynthèse (Cai et al., 2015), certaines iACCB des zones oxiques du sédiment pourraient être photosynthétiques. Toutefois, à l'heure actuelle, la photosynthèse reste un mode trophique spécifique des iACCB appartenant aux *Cyanobacteria.*

Conclusion générale

Dans le cadre de cette thèse, nous avons élaboré une stratégie de classification nous permettant d'étudier la diversité des MTB produisant des phases carbonatées dans le lac Pavin. Ce travail a permis l'étude de la diversité phénotypique et génotypique de ces populations par une combinaison d'approches en écologie microbienne, minéralogie, génomique, de tri de cellule unique au niveau de la communauté et de l'environnement naturel au laboratoire. Leur caractérisation a été possible uniquement grâce à leur propriété magnétotactique et à leur abondance dans les eaux et sédiments du lac Pavin.

Nous avons découvert une grande diversité d'inclusions de carbonates d'alcalino-terreux (iAXC) chez différents morphotypes de $_{iAXC}$MTB et de $_{iACC}$B appartenant aux classes des *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, et à l'embranchement des *Thermodesulfobacteriota*. Ces $_{iACC}$B ont des métabolismes variés, basés sur la fixation du CO_2 et des composés en C1, l'oxydation des composés soufrés réduits et de l'hydrogène, en anaérobiose et microaérophilie. Nous les avons observés dans des habitats aquatiques différents, mais vraisemblablement avec des niches géochimiques pouvant être pilotées par la minéralisation de la matière organique. En ce sens, le lac Pavin est un site remarquable car sa stratification chimique notamment en oxygène, et son histoire volcanique, permettent l'existence d'une boucle microbienne autour des cycles du CO_2 et du CH_4. Les $_{iACC}$B profitent de réseaux syntrophiques relarguant sûrement d'importantes quantités de CO_2 à partir des flux de CH_4 d'origine archéenne qui profitent aux méthanotrophes juste en-dessous de l'OATZ.

Les phases carbonatées sont contenues dans des inclusions entourées d'une membrane. Leur taille, morphologie et organisation régulières et homogènes au sein de chaque espèce vont dans le sens où les iAXC seraient des « carbonatosomes », i.e. des organites procaryotes similaires aux magnétosomes. Ils rempliraient diverses fonctions physiologiques dont la plus importante serait de constituer une réserve de carbone inorganique amorphe pour les besoins énergétiques cellulaires. Mais il n'est pas à exclure d'autres fonctions comme (i) la régulation du pH intracellulaire lors de la fixation du C, (ii) la régulation du Ca^{2+} et Ba^{2+} intra-cytoplasmique ou (iii), la modification de la flottabilité cellulaire induite par la densité élevée des iACC.

Tout comme les magnétosomes, les « carbonatosomes » des MTB peuvent être de composition différente en incorporant soit le calcium, le baryum ou le magnésium de manière sélective. Nous avons obtenu des données environnementales suggérant que l'assimilation préférentielle de l'élément alcalino-terreux est contrôlée, tout comme la formation des vésicules. De plus l'homéostasie du calcium et des ions bicarbonates dans l'organite sont indépendants de la calcyanine, protéine signature des iACC chez les *Cyanobacteria.* A la lumière de ces éléments et de la distribution polyphylétique des $_{iACC}$B magnétotactiques et non magnétotactiques, il est probable que la carbonatogenèse

intracellulaire ait émergée plusieurs fois à partir d'ancêtres différents, et possiblement pour assurer des fonctions différentes.

Perspectives

Cette étude ouvre de nouvelles perspectives qui permettront à plus long terme de comprendre les différents mécanismes moléculaires et environnementaux à l'origine de la formation des iAXC chez la diversité bactérienne capable de ce type de biominéralisation.

1) Elucider les déterminants génétiques impliqués dans la formation des iAXC

Plusieurs perspectives méthodologiques peuvent être proposées pour déterminer les mécanismes génétiques sous-jacents à la formation des biominéraux. La recherche d'un pangénome pour les populations $_{iAXC}$MTB $_{/iAXC}$B permettrait d'apporter des informations sur la gamme complète de gènes dans les génomes et apporterait certainement plus de robustesse pour l'analyse des MGC et des voies métaboliques prédites. N'ayant pas identifié de gènes potentiellement impliqués dans la formation de carbonates intracellulaires, il serait intéressant en parallèle d'analyser les relations de parenté entre certains gènes fonctionnels, e.g., les gènes *cbbM*, *cbbSL*, *ccyA* chez les *Alpha-* et *Gammaproteobacteria* magnétotactiques pour tester les différentes hypothèses sur l'émergence de la carbonatogenèse et de son origine polyphylétique (e.g. transferts horizontaux de gènes, variation adaptative sélectionnée par l'environnement, épigénétique).

2) Elucider les déterminants environnementaux impliqués dans la formation des iAXC.

La caractérisation géochimique de la colonne d'eau et des sédiments du Lac Pavin suggère que les $_{iAXC}$MTB occupent différentes niches écologiques en fonction de la nature des inclusions produites. Bien qu'il semble y avoir une stratification des $_{iACC}$MTB et $_{iABC}$MTB dans les sédiments, nous avons besoin de réaliser des analyses géochimiques complémentaires du sédiment afin d'émettre des conclusions sur leur distribution respective. Nous attendons également des profils manquants au niveau de la colonne d'eau à ce jour. L'analyse de la géochimie d'autres environnements aquatiques dans le futur comme ceux que nous avons vu dans cette thèse devrait également complémenter les données géochimiques du lac Pavin. Les lacs anoxiques avec beaucoup de matière organique en décomposition sont des lieux d'échantillonnage à privilégier car ils semblent être des *hot spots* à $_{iACC}$B, à cause des flux de CH_4 et CO_2 qu'il faudrait mesurer systématiquement à l'avenir. Ces variables géochimiques seront un atout précieux pour

comprendre les conditions requises pour la formation des iAXC mais aussi pour développer un modèle de $_{iAXC}$MTB en culture.

3) Développer la culture d'une $_{iAXC}$MTB

La culture d'une bactérie pouvant former des inclusions de carbonate de Ca ou de Ba, magnétique ou non magnétique permettrait d'étudier les gènes fonctionnels impliqués dans la biominéralisation par des expériences de délétion de gènes. Plusieurs perspectives méthodologiques pour l'isolement des $_{iAXC}$B peuvent être proposées. En s'inspirant des données génomiques et des données géochimiques, nous pourrions (i) réaliser des milieux de culture à gradients (e.g. O_2/H_2S, NO_3/H_2S, SO_4/CH_4, NO_3/CH_4) avec un inoculum important (en considérant l'effet concentration-dépendant), (ii) utiliser des protocoles standard de concentration et purification des MTB (i.e. *capillary racetrack*, tri des MTB par micromanipulation), (ii) concevoir un milieu de culture pour chaque $_{iAXC}$MTB suivant les prédictions métaboliques (e.g. autotrophie, réduction des nitrates, sulfoxydation pour les *Pseudomonadota* et autotrophie, sulfatoréduction pour les *Thermodesulfobacteriota*).

4) Etude de l'incorporation du C et du Ca chez les $_{iACC}$MTB

Les prédictions métaboliques des $_{iACC}$MTB pourraient être testées en combinant l'analyse des interactions chimiques (bactéries/substrats) par des analyses géochimiques et minéralogiques de marquage isotopique (i.e. méthodes micro(spectro)scopies de haute résolution ; NanoSIMS). Par exemple, des échantillons prélevés de iA$_{CC}$MTB pourraient être incubés avec le ^{44}Ca (sous forme de $CaCl_2$). Puis les MTB seraient enrichies par tri magnétique. Le rapport $^{44}Ca/^{40}Ca$ serait ensuite mesuré dans les cellules. Parallèlement, deux sources de ^{13}C pourraient être testées: du C inorganique ($NaH^{13}CO_3$) et du C organique (^{13}C-acétate) pour évaluer la capacité de ces microorganismes à 1) fixer du carbone inorganique ; 2) l'incorporer dans les carbonates ; 3) mesurer les taux d'incorporation et analyser l'hétérogénéité populationnelle de ces taux. Ces expériences pourraient être réalisées sur les échantillons du sédiment pour lesquels les bactéries produisant des iAXC se maintiennent durant plusieurs mois, voire même présentent une augmentation de leur concentration. Le morphotype 1 serait donc le candidat idéal pour la réalisation de telles expériences.

5) Etudier l'agencement de deux organites procaryotes dans une même cellule.

Afin d'analyser plus précisément les mécanismes de nucléation et l'organisation des biominéraux de iACC par rapport aux magnétosomes sans les dégrader, il serait intéressant de réaliser des analyses en cryo-tomographie pour visualiser en trois dimensions les cellules de $_{iAXC}$MTB hydratées et dans leur état natif. En effet, lorsque les cellules sont déposées sur les grilles de microscopie, les cellules sont déshydratées et

l'organisation des carbonates peut être altérée au sein du cytoplasme. Ces analyses apporteraient donc des éléments de réponse aux différents questionnements suivants : *est-ce que ces inclusions sont espacées entre elles* ? *ou au contraire, sont-elles agglomérées comme le suggèrent les observations en ME*T ? *est-ce que les inclusions d'ACC peuvent perturber la synthèse des magnétosomes et influer sur la magnétoréception de certains morphotypes de* $_{iACC}$*MTB, e.g., morphotype 3* ?

6) Explorer la diversité des autres $_{iACC}$B

Nous avons vu les $_{iACC}$MTB parce que les inclusions étaient faciles à reconnaître sous le microscope optique. Mais il existe des carbonates visibles uniquement une fois les préparations observées avec d'autres équipements plus puissants. Il existe surement des souches types en culture formant des carbonates en autotrophie, ou d'autres bactéries environnementales dont les inclusions sont identifiées à tort comme d'autres corps cellulaires. La recherche de marqueurs spécifiques aux $_{iACC}$B par des méthodes de *genome mining*, tout comme le développement d'outils de microscopie haut débit pourrait alors permettre de trouver de nouvelles espèces formant des carbonates intracellulaires.

Bibliographie

Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., Genene, T., 2018. Microbial Function on Climate Change - A Review. Environment Pollution and Climate Change 02. https://doi.org/10.4172/2573-458X.1000147

Abreu, F., Carolina, A., Araujo, V., Leão, P., Silva, K.T., Carvalho, F.M. de, Cunha, O. de L., Almeida, L.G., Geurink, C., Farina, M., Rodelli, D., Jovane, L., Pellizari, V.H., Vasconcelos, A.T. de, Bazylinski, D.A., Lins, U., 2016. Culture-independent characterization of novel psychrophilic magnetotactic cocci from Antarctic marine sediments. Environ. Microbiol. 18, 4426–4441. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13388

Abreu, F., Leão, P., Vargas, G., Cypriano, J., Figueiredo, V., Enrich-Prast, A., Bazylinski, D.A., Lins, U., 2018. Culture-independent characterization of a novel magnetotactic member affiliated to the Beta class of the Proteobacteria phylum from an acidic lagoon. Environ Microbiol 20, 2615–2624. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14286

Abreu, F., Martins, J.L., Silveira, T.S., Keim, C.N., de Barros, H.G.P.L., Filho, F.J.G., Lins, U., 2007. "Candidatus Magnetoglobus multicellularis", a multicellular, magnetotactic prokaryote from a hypersaline environment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 1318–1322. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64857-0

Abreu, F., Morillo, V., Nascimento, F.F., Werneck, C., Cantão, M.E., Ciapina, L.P., de Almeida, L.G.P., Lefèvre, C.T., Bazylinski, D.A., de Vasconcelos, A.T.R., Lins, U., 2014. Deciphering unusual uncultured magnetotactic multicellular prokaryotes through genomics. ISME J 8, 1055–1068. https://doi.org/10.1038/ismej.2013.203

Adam, P.S., Borrel, G., Gribaldo, S., 2018. Evolutionary history of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, one of the oldest enzymatic complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences 115, E1166–E1173. https://doi.org/10.1073/pnas.1716667115

Addadi, L., Raz, S., Weiner, S., 2003. Taking Advantage of Disorder: Amorphous Calcium Carbonate and Its Roles in Biomineralization. Cheminform 34. https://doi.org/10.1002/chin.200333237

Albéric, P., Jézéquel, D., Bergonzini, L., CHAPRON, E., Viollier, E., Massault, M., Michard, G., 2013. Carbon Cycling and Organic Radiocarbon Reservoir Effect in a Meromictic Crater Lake (Lac Pavin, Puy-de-Dôme, France). Radiocarbon 55. https://doi.org/10.2458/azu_js_rc.55.16325

Albers, P., Maier, M., Reisinger, M., Hannebauer, B., Weinand, R., 2015. Physical boundaries within aggregates – differences between amorphous, para-crystalline, and crystalline Structures. Crystal Research and Technology 50, 846–865. https://doi.org/10.1002/crat.201500040

Alcocer, J., Ruiz-Fernández, A.C., Escobar, E., Pérez-Bernal, L.H., Oseguera, L.A., Ardiles-Gloria, V., 2014. Deposition, burial and sequestration of carbon in an oligotrophic, tropical lake. Journal of Limnology 73. https://doi.org/10.4081/jlimnol.2014.783

Altman, T., Travers, M., Kothari, A., Caspi, R., Karp, P.D., 2013. A systematic comparison of the MetaCyc and KEGG pathway databases. BMC Bioinformatics 14, 112. https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-112

Amann, R., Peplies, J., Schüler, D., 2007. Diversity and Taxonomy of Magnetotactic Bacteria, in: Schüler, D. (Ed.), Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria, Microbiology Monographs. Springer Berlin / Heidelberg, pp. 25–36.

Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology.

Journal of Bacteriology 172, 762–770. https://doi.org/10.1128/jb.172.2.762-770.1990
Amor, M., Busigny, V., Louvat, P., Tharaud, M., Gelabert, A., Cartigny, P., Carlut, J., Isambert, A., Durand-Dubief, M., Ona-Nguema, G., Alphandery, E., Chebbi, I., Guyot, F., 2018. Iron uptake and magnetite biomineralization in the magnetotactic bacterium Magnetospirillum magneticum strain AMB-1: An iron isotope study. Geochim. Cosmochim. Acta 232, 225–243. https://doi.org/10.1016/j.gca.2018.04.020
Amor, M., Mathon, F.P., Monteil, C.L., Busigny, V., Lefevre, C.T., 2020. Iron-biomineralizing organelle in magnetotactic bacteria: function, synthesis and preservation in ancient rock samples. Environmental Microbiology 22, 3611–3632. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15098
Anbu, P., Kang, C.-H., Shin, Y.-J., So, J.-S., 2016. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. SpringerPlus 5, 250. https://doi.org/10.1186/s40064-016-1869-2
Antipov, D., Korobeynikov, A., McLean, J.S., Pevzner, P.A., 2016. hybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. Bioinformatics 32, 1009–1015. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv688
Arp, G., Reimer, A., Reitner, J., 2001. Photosynthesis-Induced Biofilm Calcification and Calcium Concentrations in Phanerozoic Oceans. Science 292, 1701–1704. https://doi.org/10.1126/science.1057204
Babenzien, H.-D., 1991. Achromatium oxaliferum and its ecological niche. Zentralblatt für Mikrobiologie 146, 41–49. https://doi.org/10.1016/S0232-4393(11)80258-1
Babenzien, H.-D., Sass, H., 1996. The sediment-water interface - habitat of the unusual bacterium Achromatium oxaliferum. Advances in Limnology 48, 247–251.
Baldi, F., Pepi, M., Burrini, D., Kniewald, G., Scali, D., Lanciotti, E., 1996. Dissolution of Barium from Barite in Sewage Sludges and Cultures of Desulfovibrio desulfuricans. Applied and environmental microbiology 62, 2398–404. https://doi.org/10.1128/AEM.62.7.2398-2404.1996
Barton, L.L., Fauque, G.D., 2009. Chapter 2 Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria, in: Microbiology, B.-A. in A. (Ed.), . Academic Press, pp. 41–98.
Bazylinski, D., Williams, T., 2007. Ecophysiology of Magnetotactic Bacteria, in: Schüler, D. (Ed.), Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria, Microbiology Monographs. Springer Berlin / Heidelberg, pp. 37–75.
Bazylinski, D.A., Dean, A.J., Williams, T.J., Long, L.K., Middleton, S.L., Dubbels, B.L., 2004. Chemolithoautotrophy in the marine, magnetotactic bacterial strains MV-1 and MV-2. Arch. Microbiol. 182, 373–387. https://doi.org/10.1007/s00203-004-0716-y
Bazylinski, D.A., Frankel, R.B., 2004. Magnetosome formation in prokaryotes. Nat. Rev. Microbiol. 2, 217–230. https://doi.org/10.1038/nrmicro842
Bazylinski, D.A., Frankel, R.B., 2003. Biologically controlled mineralization in prokaryotes, in: Dove, P.M., DeYoreo, J.J., Weiner, S. (Eds.), Biomineralization. Mineralogical Soc America, Washington, pp. 217–247.
Bazylinski, D.A., Frankel, R.B., Heywood, B.R., Ahmadi, S., King, J.W., Donaghay, P.L., Hanson, A.K., 1995. Controlled biomineralization of magnetite (Fe3O4) and greigite (Fe3S4). Appl. Environ. Microbiol. 61, 3232–3239.
Bazylinski, D.A., Heywood, B.R., Mann, S., Frankel, R.B., 1993. Fe3O4 and Fe3S4 in a bacterium. Nature 366, 218–218. https://doi.org/10.1038/366218a0
Bazylinski, D.A., Lefèvre, C.T., 2013. Magnetotactic bacteria from extreme environments. Life 3, 295–307.
Beck, D.A.C., McTaggart, T.L., Setboonsarng, U., Vorobev, A., Goodwin, L., Shapiro, N., Woyke, T., Kalyuzhnaya, M.G., Lidstrom, M.E., Chistoserdova, L., 2015.

Multiphyletic origins of methylotrophy in Alphaproteobacteria, exemplified by comparative genomics of Lake Washington isolates. Environ Microbiol 17, 547–554. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12736

Begall, S., Burda, H., Malkemper, E.P., 2014. Chapter Two - Magnetoreception in Mammals, in: Naguib, M., Barrett, L., Brockmann, H.J., Healy, S., Mitani, J.C., Roper, T.J., Simmons, L.W. (Eds.), Advances in the Study of Behavior. Academic Press, pp. 45–88. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800286-5.00002-X

Bellinger, M.R., Wei, J., Hartmann, U., Cadiou, H., Winklhofer, M., Banks, M.A., 2022. Conservation of magnetite biomineralization genes in all domains of life and implications for magnetic sensing. Proc Natl Acad Sci U S A 119, e2108655119. https://doi.org/10.1073/pnas.2108655119

Benidire, L., El Khalloufi, F., Oufdou, K., Barakat, M., Tulumello, J., Ortet, P., Heulin, T., Achouak, W., 2020. Phytobeneficial bacteria improve saline stress tolerance in Vicia faba and modulate microbial interaction network. Science of The Total Environment 729, 139020. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139020

Benzerara, K., Bolzoni, R., Monteil, C., Beyssac, O., Forni, O., Alonso, B., Asta, M.P., Lefevre, C., 2021. The gammaproteobacterium Achromatium forms intracellular amorphous calcium carbonate and not (crystalline) calcite. Geobiology 19, 199–213. https://doi.org/10.1111/gbi.12424

Benzerara, K., Duprat, E., Bitard-Feildel, T., Caumes, G., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., Dezi, M., Diop, S. issa, Gaschignard, G., Görgen, S., Gugger, M., López-García, P., Millet, M., Skouri-Panet, F., Moreira, D., Callebaut, I., 2022a. A New Gene Family Diagnostic for Intracellular Biomineralization of Amorphous Ca Carbonates by Cyanobacteria. Genome Biology and Evolution 14, evac026. https://doi.org/10.1093/gbe/evac026

Benzerara, K., Duprat, E., Bitard-Feildel, T., Caumes, G., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., Dezi, M., Diop, S.I., Gaschignard, G., Görgen, S., Gugger, M., López-García, P., Millet, M., Skouri-Panet, F., Moreira, D., Callebaut, I., 2022b. A New Gene Family Diagnostic for Intracellular Biomineralization of Amorphous Ca Carbonates by Cyanobacteria. Genome Biology and Evolution 14, evac026. https://doi.org/10.1093/gbe/evac026

Benzerara, K., Elmaleh, A., Ciobanu, M.-C., De Wever, A., Bertolino, P., Iniesto, M., Jézéquel, D., Lopez-Garcia, P., Menguy, N., Muller, E., Skouri-Panet, F., Swaraj, S., Tavera, R., Thomazo, C., Moreira, D., 2023. Biomineralization of Fe- and Mn-rich silicates by cyanobacteria under oxic and alkaline conditions. https://doi.org/10.5194/bg-2023-90

Benzerara, K., Miot, J., Morin, G., Ona-Nguema, G., Skouri-Panet, F., Férard, C., 2011. Significance, mechanisms and environmental implications of microbial biomineralization. Comptes Rendus Geoscience 343, 160–167. https://doi.org/10.1016/j.crte.2010.09.002

Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Li, J., Ferard, C., Gugger, M., Laurent, T., Couradeau, E., Ragon, M., Cosmidis, J., Menguy, N., Margaret-Oliver, I., Tavera, R., Lopez-Garcia, P., Moreira, D., 2014a. Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences 111, 10933. https://doi.org/10.1073/1403510111

Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Li, J., Férard, C., Gugger, M., Laurent, T., Couradeau, E., Ragon, M., Cosmidis, J., Menguy, N., Margaret-Oliver, I., Tavera, R., López-García, P., Moreira, D., 2014b. Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences 111, 10933–10938. https://doi.org/10.1073/pnas.1403510111

Benzerara, K., Yoon, T.H., Tyliszczak, T., Constantz, B., Spormann, A.M., Brown, G.E., 2004. Scanning transmission X-ray microscopy study of microbial calcification. Geobiology 2, 249–259. https://doi.org/10.1111/j.1472-4677.2004.00039.x

Berenjian, A., Seifan, M., 2022. Mineral Formation by Microorganisms: Concepts and Applications. Springer Nature.

Berg, I.A., Kockelkorn, D., Buckel, W., Fuchs, G., 2007. A 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate Autotrophic Carbon Dioxide Assimilation Pathway in Archaea. Science 318, 1782–1786. https://doi.org/10.1126/science.1149976

Berg, J., Duverger, A., Cordier, L., Laberty, C., Guyot, F., Miot, J., 2020. Rapid pyritization in the presence of a sulfur/sulfate-reducing bacterial consortium. Scientific Reports 10, 8264. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64990-6

Berg, J.S., Jézéquel, D., Duverger, A., Lamy, D., Laberty-Robert, C., Miot, J., 2019. Microbial diversity involved in iron and cryptic sulfur cycling in the ferruginous, low-sulfate waters of Lake Pavin. PLoS ONE 14, e0212787. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212787

Berg, J.S., Schwedt, A., Kreutzmann, A.-C., Kuypers, M.M.M., Milucka, J., 2014. Polysulfides as Intermediates in the Oxidation of Sulfide to Sulfate by Beggiatoa spp. Applied and Environmental Microbiology 80, 629–636. https://doi.org/10.1128/AEM.02852-13

Bettarel, Y., Amblard, C., Sime-Ngando, T., Carrias, J.-F., Sargos, D., Garabétian, F., Lavandier, P., 2003. Viral lysis, flagellate grazing potential, and bacterial production in Lake Pavin. Microb Ecol 45, 119–127. https://doi.org/10.1007/s00248-002-1016-1

Bettarel, Yvan, Sime-Ngando, T., Amblard, C., Carrias, J.-F., Portelli, C., 2003. Virioplankton and microbial communities in aquatic systems: a seasonal study in two lakes of differing trophy. Freshwater Biology 48, 810–822.

Bidaud, C., 2018. Phosphorus sequestration by magnetotactic bacteria in the stratified water column of Lake Pavin (These en préparation). Université Paris Cité.

Bidaud, C., Monteil, C.L., Menguy, N., Busigny, V., Jézéquel, D., Viollier, E., Travert, C., Skouri-Panet, F., Benzerara, K., Lefevre, C.T., Duprat, E., 2021. Population structure of magnetotactic bacteria forming intracellular polyphosphates in the water column of Lake Pavin, a freshwater ferruginous environment EGU21-11061.

Bidaud, C.C., Monteil, C.L., Menguy, N., Busigny, V., Jézéquel, D., Viollier, É., Travert, C., Skouri-Panet, F., Benzerara, K., Lefevre, C.T., Duprat, É., 2022a. Biogeochemical Niche of Magnetotactic Cocci Capable of Sequestering Large Polyphosphate Inclusions in the Anoxic Layer of the Lake Pavin Water Column. Frontiers in Microbiology 12.

Bidaud, C.C., Monteil, C.L., Menguy, N., Busigny, V., Jézéquel, D., Viollier, É., Travert, C., Skouri-Panet, F., Benzerara, K., Lefevre, C.T., Duprat, É., 2022b. Biogeochemical Niche of Magnetotactic Cocci Capable of Sequestering Large Polyphosphate Inclusions in the Anoxic Layer of the Lake Pavin Water Column. Frontiers in Microbiology 12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.789134

Biderre-Petit, C., Jézéquel, D., Dugat-Bony, E., Lopes, F., Kuever, J., Borrel, G., Viollier, E., Fonty, G., Peyret, P., 2011. Identification of microbial communities involved in the methane cycle of a freshwater meromictic lake. FEMS Microbiology Ecology 77, 533–45. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01134.x

Biderre-Petit, C., Taib, N., Gardon, H., Hochart, C., Debroas, D., 2019a. New insights into the pelagic microorganisms involved in the methane cycle in the meromictic Lake Pavin through metagenomics. FEMS Microbiology Ecology 95, fiy183. https://doi.org/10.1093/femsec/fiy183

Biderre-Petit, C., Taib, N., Gardon, H., Hochart, C., Debroas, D., 2019b. New insights into the pelagic microorganisms involved in the methane cycle in the meromictic Lake

Pavin through metagenomics. FEMS Microbiology Ecology 95, fiy183. https://doi.org/10.1093/femsec/fiy183
Blakemore, R., 1975. Magnetotactic bacteria. Science 190, 377–379. https://doi.org/10.1126/science.170679
Blakemore, R.P., Maratea, D., Wolfe, R.S., 1979. Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. J. Bacteriol. 140, 720–729.
Blondeau, M., Benzerara, K., Ferard, C., Guigner, J.-M., Poinsot, M., Coutaud, M., Tharaud, M., Cordier, L., Skouri-Panet, F., 2018a. Impact of the cyanobacterium Gloeomargarita lithophora on the geochemical cycles of Sr and Ba. Chemical Geology 483, 88–97. https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.02.029
Blondeau, M., Sachse, M., Boulogne, C., Gillet, C., Guigner, J.-M., Skouri-Panet, F., Poinsot, M., Ferard, C., Miot, J., Benzerara, K., 2018b. Amorphous Calcium Carbonate Granules Form Within an Intracellular Compartment in Calcifying Cyanobacteria. Front Microbiol 9, 1768. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01768
Bochet, O., Bethencourt, L., Dufresne, A., Farasin, J., Pédrot, M., Labasque, T., Chatton, E., Lavenant, N., Petton, C., Abbott, B.W., Aquilina, L., Le Borgne, T., 2020. Iron-oxidizer hotspots formed by intermittent oxic–anoxic fluid mixing in fractured rocks. Nat. Geosci. 13, 149–155. https://doi.org/10.1038/s41561-019-0509-1
Borrel, G., 2011. Diversité des archées et implication de la composante procaryote dans le cycle biogéochimique du méthane en milieu aquatique continental : études taxonomiques et fonctionnelles dans la colonne d'eau et les sédiments anoxiques du lac Pavin (phdthesis). Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II.
Borrel, G., Colombet, J., Robin, A., Lehours, A.-C., Prangishvili, D., Sime-Ngando, T., 2012a. Unexpected and novel putative viruses in the sediments of a deep-dark permanently anoxic freshwater habitat. ISME J 6, 2119–2127. https://doi.org/10.1038/ismej.2012.49
Borrel, G., Jézéquel, D., Biderre-Petit, C., Morel-Desrosiers, N., Morel, J.-P., Peyret, P., Fonty, G., Lehours, A.-C., 2011. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. Research in Microbiology, Special issue on environmental microbiology 162, 832–847. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.06.004
Borrel, G., Joblin, K., Guedon, A., Colombet, J., Tardy, V., Lehours, A.-C., Fonty, G., 2012b. Methanobacterium lacus sp. nov., isolated from the profundal sediment of a freshwater meromictic lake. Int J Syst Evol Microbiol 62, 1625–1629. https://doi.org/10.1099/ijs.0.034538-0
Borrel, G., Lehours, A.-C., Crouzet, O., Jézéquel, D., Rockne, K., Kulczak, A., Duffaud, E., Joblin, K., Fonty, G., 2012c. Stratification of Archaea in the Deep Sediments of a Freshwater Meromictic Lake: Vertical Shift from Methanogenic to Uncultured Archaeal Lineages. PLoS One 7, e43346. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043346
Braakman, R., Smith, E., 2012. The emergence and early evolution of biological carbon-fixation. PLoS Comput Biol 8, e1002455. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002455
Brownlee, C., Langer, G., Wheeler, G.L., 2021. Coccolithophore calcification: Changing paradigms in changing oceans. Acta Biomaterialia, Biomineralization: From Cells to Biomaterials 120, 4–11. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.050
Büchner, C., Heyde, M., 2017. Two-dimensional silica opens new perspectives. Progress in Surface Science 92, 341–374. https://doi.org/10.1016/j.progsurf.2017.09.001
Buck, M., Garcia, S.L., Fernandez, L., Martin, G., Martinez-Rodriguez, G.A., Saarenheimo, J., Zopfi, J., Bertilsson, S., Peura, S., 2021. Comprehensive dataset of shotgun metagenomes from oxygen stratified freshwater lakes and ponds. Sci Data 8, 131. https://doi.org/10.1038/s41597-021-00910-1

Buckel, W., Thauer, R.K., 2018. Flavin-Based Electron Bifurcation, Ferredoxin, Flavodoxin, and Anaerobic Respiration With Protons (Ech) or NAD+ (Rnf) as Electron Acceptors: A Historical Review. Frontiers in Microbiology 9.

Bura-Nakic, E., Viollier, E., Jezequel, D., Thiam, A., Ciglenecki, I., 2009. Reduced sulfur and iron species in anoxic water column of meromictic crater Lake Pavin (Massif Central, France). Chem. Geol. 266, 311–317. https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2009.06.020

Burks, C., Fickett, J.W., Goad, W.B., Kanehisa, M., Lewitter, F.I., Rindone, W.P., Swindell, C.D., Tung, C.-S., Bilofsky, H.S., 1985. CABIOS REVIEW: The GenBank nucleic acid sequence database. Bioinformatics 1, 225–233. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/1.4.225

Busigny, V., Jézéquel, D., Cosmidis, J., Viollier, E., Benzerara, K., Planavsky, N.J., Albéric, P., Lebeau, O., Sarazin, G., Michard, G., 2016. The Iron Wheel in Lac Pavin: Interaction with Phosphorus Cycle, in: Sime-Ngando, T., Boivin, P., Chapron, E., Jezequel, D., Meybeck, M. (Eds.), Lake Pavin: History, Geology, Biogeochemistry, and Sedimentology of a Deep Meromictic Maar Lake. Springer International Publishing, Cham, pp. 205–220. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39961-4_12

Busigny, V., Mathon, F.P., Jézéquel, D., Bidaud, C.C., Viollier, E., Bardoux, G., Bourrand, J.-J., Benzerara, K., Duprat, E., Menguy, N., Monteil, C.L., Lefevre, C.T., 2021. Mass collection of magnetotactic bacteria from the permanently stratified ferruginous Lake Pavin, France. Environ Microbiol. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15458

Byrne, J.M., Klueglein, N., Pearce, C., Rosso, K.M., Appel, E., Kappler, A., 2015. Redox cycling of Fe(II) and Fe(III) in magnetite by Fe-metabolizing bacteria. Science 347, 1473–1476. https://doi.org/10.1126/science.aaa4834

Cai, H., Cui, H., Zeng, Y., Wang, Y., Jiang, H., 2018. Niveispirillum lacus sp. nov., isolated from cyanobacterial aggregates in a eutrophic lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 68, 507–512. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002526

Cai, H., Wang, Y., Xu, H., Yan, Z., Jia, B., Majid Maszenan, A., Jiang, H., 2015. Niveispirillum cyanobacteriorum sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from cyanobacterial aggregates in a eutrophic lake. Int J Syst Evol Microbiol 65, 2537–2541. https://doi.org/10.1099/ijs.0.000299

Cam, N., Benzerara, K., Georgelin, T., Jaber, M., Lambert, J.-F., Poinsot, M., Skouri-Panet, F., Cordier, L., 2016. Selective Uptake of Alkaline Earth Metals by Cyanobacteria Forming Intracellular Carbonates. Environ. Sci. Technol. 50, 11654–11662. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02872

Cam, N., Benzerara, K., Georgelin, T., Jaber, M., Lambert, J.-F., Poinsot, M., Skouri-Panet, F., Moreira, D., Lopez-Garcia, P., Raimbault, E., Cordier, L., Jézéquel, D., 2017. Cyanobacterial formation of intracellular Ca-carbonates in undersaturated solutions. Geobiology 16. https://doi.org/10.1111/gbi.12261

Cam, N., Georgelin, T., Jaber, M., Lambert, J.-F., Benzerara, K., 2015. In vitro synthesis of amorphous Mg-, Ca-, Sr- and Ba-carbonates: what do we learn about intracellular calcification by cyanobacteria? Geochimica et Cosmochimica Acta 161, 36. https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.04.003

Camus, G., Michard, G., Olive, P., Boivin, P., Desgranges, P., Jezequel, D., Meybeck, M., Peyrus, J.C., Vinson, J.M., Viollier, E., Kornprobst, J., 1993. Risques d'eruption gazeuse carbonique en Auvergne. Bulletin de la Société Géologique de France 164, 767–781.

Cardoso, R.B., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Flores, E.R., Gómez, J., Field, J.A., 2006. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. Biotechnol Bioeng 95, 1148–1157. https://doi.org/10.1002/bit.21084

Carrieri, D., Wawrousek, K., Eckert, C., Yu, J., Maness, P.-C., 2011. The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria. Bioresour Technol 102, 8368–8377. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.103

Caspi, R., Altman, T., Dreher, K., Fulcher, C.A., Subhraveti, P., Keseler, I.M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L.A., Ong, Q., Paley, S., Pujar, A., Shearer, A.G., Travers, M., Weerasinghe, D., Zhang, P., Karp, P.D., 2012. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. Nucleic Acids Res. 40, D742-753. https://doi.org/10.1093/nar/gkr1014

Castanier, S., Métayer-Levrel, G.L., Perthuisot, J., 1998. La carbonatogenèse bactérienne.

Caumartin, J., Benzerara, K., Havas, R., Thomazo, C., Lopez-Garcia, P., Duprat, E., 2023. The chemical conditions necessary for the formation of microbialites. Geochemical Perspectives Letters 25, 30–35. https://doi.org/10.7185/geochemlet.2311

Chapron, E., Ledoux, G., Simonneau, anaëlle, Albéric, P., St-Onge, G., Lajeunesse, P., Boivin, P., Desmet, M., 2011. New Evidence of Holocene Mass Wasting Events in Recent Volcanic Lakes from the French Massif Central (Lakes Pavin, Montcineyre and Chauvet) and Implications for Natural Hazards, proceeding of ISSMMTC. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2162-3_23

Chassiot, L., Miras, Y., Chapron, E., Develle, A.-L., Arnaud, F., Motelica-Heino, M., Di Giovanni, C., 2018. A 7000-year environmental history and soil erosion record inferred from the deep sediments of Lake Pavin (Massif Central, France). Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 497, 218–233. https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2018.02.024

Chaudhry, F.M., Wallace, A., Mueller, R.T., 1977. Barium toxicity in plants. Communications in Soil Science and Plant Analysis 8, 795–797. https://doi.org/10.1080/00103627709366776

Chaumeil, P.-A., Mussig, A.J., Hugenholtz, P., Parks, D.H., 2022. GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database. Bioinformatics 38, 5315–5316. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac672

Chaumeil, P.-A., Mussig, A.J., Hugenholtz, P., Parks, D.H., 2020. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. Bioinformatics 36, 1925–1927. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848

Chen, R.-W., Wang, K.-X., Zhou, X.-F., Long, C., Tian, X.-P., Long, L.-J., 2018. Indioceanicola profundi gen. nov., sp. nov., isolated from Indian Ocean sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 68, 3707–3712. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003016

Chen, S., Liu, H., Zhang, H., Li, K., Wang, N., Sun, W., Liu, X., Niu, L., Ma, B., Yang, F., Li, H., Zhao, D., Xing, Y., 2023. Temporal patterns of algae in different urban lakes and their correlations with environmental variables in Xi'an, China. Journal of Environmental Sciences 133, 138–151. https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.07.036

Chen, Y., Ju, L., Rushdi, M., Ge, C., Zhu, C., 2017. Receptor-mediated cell mechanosensing. Mol Biol Cell 28, 3134–3155. https://doi.org/10.1091/mbc.E17-04-0228

Chistoserdova, L., Kalyuzhnaya, M.G., 2018. Current Trends in Methylotrophy. Trends in Microbiology 26, 703–714. https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.011

Chistoserdova, L., Kalyuzhnaya, M.G., Lidstrom, M.E., 2009. The Expanding World of Methylotrophic Metabolism. Annu Rev Microbiol 63, 477–499. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073600

Cline, J.D., 1969. Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide in Natural Waters1. Limnology and Oceanography 14, 454–458. https://doi.org/10.4319/lo.1969.14.3.0454

Clites, B.L., Pierce, J.T., 2017. Identifying Cellular and Molecular Mechanisms for Magnetosensation. Annu Rev Neurosci 40, 231–250. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031312

Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, S., McGarrell, D.M., Schmidt, T.M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Ribosomal Database Project, 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. Nucleic Acids Res. 31, 442–443.

Coleman, G.A., Davín, A.A., Mahendrarajah, T.A., Szánthó, L.L., Spang, A., Hugenholtz, P., Szöllősi, G.J., Williams, T.A., 2021. A rooted phylogeny resolves early bacterial evolution. Science 372. https://doi.org/10.1126/science.abe0511

Coleman, J.R., 2000. Carbonic Anhydrase and Its Role in Photosynthesis, in: Leegood, R.C., Sharkey, T.D., von Caemmerer, S. (Eds.), Photosynthesis: Physiology and Metabolism, Advances in Photosynthesis and Respiration. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 353–367. https://doi.org/10.1007/0-306-48137-5_15

Colombet, J., Billard, H., Viguès, B., Balor, S., Boulé, C., Geay, L., Benzerara, K., Menguy, N., Ilango, G., Fuster, M., Enault, F., Bardot, C., Gautier, V., Pradeep Ram, A.S., Sime-Ngando, T., 2019. Discovery of High Abundances of Aster-Like Nanoparticles in Pelagic Environments: Characterization and Dynamics. Frontiers in Microbiology 10.

Colombet, J., Sime-Ngando, T., 2012. Seasonal Depth-Related Gradients in Virioplankton: Lytic Activity and Comparison with Protistan Grazing Potential in Lake Pavin (France). Microbial ecology 64, 67–78. https://doi.org/10.1007/s00248-012-0032-z

Colombet, J., Sime-Ngando, T., Cauchie, H.M., Fonty, G., Hoffmann, L., Demeure, G., 2006. Depth-Related Gradients of Viral Activity in Lake Pavin. Applied and Environmental Microbiology 72, 4440–4445. https://doi.org/10.1128/AEM.00021-06

Conrad, R., 2007. Microbial Ecology of Methanogens and Methanotrophs, in: Advances in Agronomy. Elsevier, pp. 1–63. https://doi.org/10.1016/S0065-2113(07)96005-8

Cornejo, E., Abreu, N., Komeili, A., 2014. Compartmentalization and Organelle Formation in Bacteria. Curr Opin Cell Biol 26, 132–138. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.12.007

Cosmidis, J., Benzerara, K., 2022. Why do microbes make minerals? Comptes Rendus. Géoscience 354, 1–39. https://doi.org/10.5802/crgeos.107

Cosmidis, J., Benzerara, K., Morin, G., Busigny, V., Lebeau, O., Jézéquel, D., Noël, V., Dublet, G., Othmane, G., 2014. Biomineralization of iron-phosphates in the water column of Lake Pavin (Massif Central, France). Geochimica et Cosmochimica Acta 126, 78–96. https://doi.org/10.1016/j.gca.2013.10.037

Couradeau, E., Benzerara, K., Gérard, E., Estève, I., Moreira, D., Tavera, R., Lopez-Garcia, P., 2013a. Cyanobacterial calcification in modern microbialites at the submicrometer scale. Biogeosciences Discussions. https://doi.org/10.5194/bgd-10-3311-2013

Couradeau, E., Benzerara, K., Gérard, E., Eve, I., Moreira, D., Tavera, R., Lopez-Garcia, P., 2013b. In situ microscale cyanobacterial calcification in modern microbialites. Biogeosciences 10, 5255–5266. https://doi.org/10.5194/bg-10-5255-2013

Couradeau, E., Benzerara, K., Gérard, E., Moreira, D., Bernard, S., Brown, G.E., López-García, P., 2012. An early-branching microbialite cyanobacterium forms intracellular carbonates. Science 336, 459–462. https://doi.org/10.1126/science.1216171

Couradeau, E., Benzerara, K., Moreira, D., Gérard, E., Kaźmierczak, J., Tavera, R., López-García, P., 2011. Prokaryotic and Eukaryotic Community Structure in Field and Cultured Microbialites from the Alkaline Lake Alchichica (Mexico). PLOS ONE 6, e28767. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028767

Cox, B.L., Popa, R., Bazylinski, D.A., Lanoil, B., Douglas, S., Belz, A., Engler, D.L., Nealson, K.H., 2002. Organization and elemental analysis of P-, S-, and Fe-rich inclusions in a population of freshwater magnetococci. Geomicrobiol. J. 19, 387–406. https://doi.org/10.1080/01490450290098504

Criscuolo, A., Gribaldo, S., 2010. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. BMC Evol. Biol. 10, 210. https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-210

De Boer, W.E., La Rivière, J.W., Schmidt, K., 1971. Some properties of Achromatium oxaliferum. Antonie Van Leeuwenhoek 37, 553–563. https://doi.org/10.1007/BF02218525

de Haan, D., Aram, L., Peled-Zehavi, H., Addadi, Y., Ben-Joseph, O., Rotkopf, R., Elad, N., Rechav, K., Gal, A., 2023. Exocytosis of the silicified cell wall of diatoms involves extensive membrane disintegration. Nat Commun 14, 480. https://doi.org/10.1038/s41467-023-36112-z

De Wever, A., Benzerara, K., Coutaud, M., Caumes, G., Poinsot, M., Skouri-Panet, F., Laurent, T., Duprat, E., Gugger, M., 2019. Evidence of high Ca uptake by cyanobacteria forming intracellular CaCO3 and impact on their growth. Geobiology 17, 676–690. https://doi.org/10.1111/gbi.12358

Define, E., Miallier, D., Pilleyre, T., Nomade, S., Guillou, H., Moska, P., Tudyka, K., Chapron, E., Virmoux, C., Queffelec, A., Jouannic, G., Cortial, C., Goslar, T., Raynal, J.-P., 2023. New investigations about three young volcano-sedimentary systems of Velay-Vivarais (France) and co-evolution humans-volcanoes in the background. Quaternaire. Revue de l'Association française pour l'étude du Quaternaire 93–122. https://doi.org/10.4000/quaternaire.17844

Descamps, E.C.T., Abbé, J.-B., Pignol, D., Lefèvre, C.T., 2016. Controlled Biomineralization of Magnetite in Bacteria, in: Faivre, D. (Ed.), Iron Oxides. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 99–116.

Descamps, E.C.T., Monteil, C.L., Menguy, N., Ginet, N., Pignol, D., Bazylinski, D.A., Lefèvre, C.T., 2017. Desulfamplus magnetovallimortis gen. nov., sp. nov., a magnetotactic bacterium from a brackish desert spring able to biomineralize greigite and magnetite, that represents a novel lineage in the Desulfobacteraceae. Syst Appl Microbiol 40, 280–289. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.05.001

Deutzmann, J.S., Schink, B., 2011. Anaerobic Oxidation of Methane in Sediments of Lake Constance, an Oligotrophic Freshwater Lake ▿ . Appl Environ Microbiol 77, 4429–4436. https://doi.org/10.1128/AEM.00340-11

Dhami, N.K., Reddy, M.S., Mukherjee, A., 2014. Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages. Frontiers in Microbiology 5.

Diaz, M.R., Eberli, G.P., Blackwelder, P., Phillips, B., Swart, P.K., 2017. Microbially mediated organomineralization in the formation of ooids. Geology 45, 771–774. https://doi.org/10.1130/G39159.1

Do, T.T.U., Tran, V.N., Kleiner, D., 2007. Physiological versatility of the genus Rhodocista. Z Naturforsch C J Biosci 62, 571–575. https://doi.org/10.1515/znc-2007-7-818

Dong, Y., Li, J., Zhang, Wuchang, Zhang, Wenyan, Zhao, Y., Xiao, T., Wu, L.-F., Pan, H., 2016. The detection of magnetotactic bacteria in deep sea sediments from the east Pacific Manganese Nodule Province. Environ Microbiol Rep 8, 239–249. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12374

Drake, H., Åström, M.E., Heim, C., Broman, C., Åström, J., Whitehouse, M., Ivarsson, M., Siljeström, S., Sjövall, P., 2015. Extreme 13C depletion of carbonates formed during oxidation of biogenic methane in fractured granite. Nat Commun 6, 7020. https://doi.org/10.1038/ncomms8020

Dubinina, G., Savvichev, A., Orlova, M., Gavrish, E., Verbarg, S., Grabovich, M., 2017. Beggiatoa leptomitoformis sp. nov., the first freshwater member of the genus capable of chemolithoautotrophic growth. Int J Syst Evol Microbiol 67, 197–204. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001584

Dubinina, G.A., Rainey, F.A., Gijs Kuenen, J., 2015. Macromonas, in: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–5. https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00949

Dumont, M.G., 2017. Primers: Functional Marker Genes for Methylotrophs and Methanotrophs, in: McGenity, T.J., Timmis, K.N., Nogales, B. (Eds.), Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Primers, Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 57–77. https://doi.org/10.1007/8623_2014_23

Dupraz, C., Reid, R.P., Braissant, O., Decho, A.W., Norman, R.S., Visscher, P.T., 2009. Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. Earth-Sci. Rev. 96, 141–162. https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2008.10.005

Dymond, J., Collier, R., 1996. Particulate barium fluxes and their relationships to biological productivity. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 43, 1283–1308. https://doi.org/10.1016/0967-0645(96)00011-2

Dziewit, L., Czarnecki, J., Prochwicz, E., Wibberg, D., Schlüter, A., Pühler, A., Bartosik, D., 2015. Genome-guided insight into the methylotrophy of Paracoccus aminophilus JCM 7686. Frontiers in Microbiology 6.

Dziuba, M.V., Müller, F.-D., Pósfai, M., Schüler, D., 2023. Exploring the host range for genetic transfer of magnetic organelle biosynthesis. Nat Nanotechnol. https://doi.org/10.1038/s41565-023-01500-5

Ehrenberg, 1836. Vorläufige Mittheilungen über das wirkliche Vorkommen fossiler Infusorien und ihre grosse Verbreitung. Annalen der Physik 114, 213–227. https://doi.org/10.1002/andp.18361140520

Eprintsev, a T., Falaleeva, M.I., Klimova, M.A., Parfenova, N.V., 2006. [Isolation and properties of malate dehydrogenase from meso- and thermophilic bacteria]. Prikl Biokhim Mikrobiol 42, 274–278.

Eren, A.M., Kiefl, E., Shaiber, A., Veseli, I., Miller, S.E., Schechter, M.S., Fink, I., Pan, J.N., Yousef, M., Fogarty, E.C., Trigodet, F., Watson, A.R., Esen, Ö.C., Moore, R.M., Clayssen, Q., Lee, M.D., Kivenson, V., Graham, E.D., Merrill, B.D., Karkman, A., Blankenberg, D., Eppley, J.M., Sjödin, A., Scott, J.J., Vázquez-Campos, X., McKay, L.J., McDaniel, E.A., Stevens, S.L.R., Anderson, R.E., Fuessel, J., Fernandez-Guerra, A., Maignien, L., Delmont, T.O., Willis, A.D., 2021. Community-led, integrated, reproducible multi-omics with anvi'o. Nat Microbiol 6, 3–6. https://doi.org/10.1038/s41564-020-00834-3

Faivre, D., Böttger, L.H., Matzanke, B.F., Schüler, D., 2007. Intracellular magnetite biomineralization in bacteria proceeds by a distinct pathway involving membrane-bound ferritin and an iron(II) species. Angew Chem Int Ed 46, 8495–8499. https://doi.org/10.1002/anie.200700927

Faivre, D., Schüler, D., 2008. Magnetotactic bacteria and magnetosomes. Chem. Rev. 108, 4875–4898. https://doi.org/10.1021/cr078258w

Falkowski, P.G., Fenchel, T., Delong, E.F., 2008. The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles. Science 320, 1034–1039. https://doi.org/10.1126/science.1153213

Farhan Ul Haque, M., Xu, H.-J., Murrell, J.C., Crombie, A., 2020. Facultative methanotrophs – diversity, genetics, molecular ecology and biotechnological potential: a mini-review. Microbiology (Reading) 166, 894–908. https://doi.org/10.1099/mic.0.000977

Field, S.J., Thorndycroft, F.H., Matorin, A.D., Richardson, D.J., Watmough, N.J., 2008. The respiratory nitric oxide reductase (NorBC) from Paracoccus denitrificans. Methods Enzymol 437, 79–101. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)37005-5

Finbow, M.E., Harrison, M.A., 1997. The vacuolar H+-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. Biochem J 324, 697–712.

Finch, A.A., Allison, N., Steaggles, H., Wood, C.V., Mosselmans, J.F.W., 2010. Ba XAFS in Ba-rich standard minerals and the potential for determining Ba structural state in calcium carbonate. Chemical Geology 270, 179–185. https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2009.11.015

Finneran, K.T., Johnsen, C.V., Lovley, D.R., 2003. Rhodoferax ferrireducens sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III). Int J Syst Evol Microbiol 53, 669–673. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02298-0

Flies, C.B., Jonkers, H.M., de Beer, D., Bosselmann, K., Bottcher, M.E., Schüler, D., 2005. Diversity and vertical distribution of magnetotactic bacteria along chemical gradients in freshwater microcosms. FEMS Microbiol. Ecol. 52, 185–195. https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.11.006

Frankel, R., Blakemore, R., Wolfe, R., 1979. Magnetite in Freshwater Magnetotactic Bacteria. Science 203, 1355–1356. https://doi.org/10.1126/science.203.4387.1355

Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., 2003. Biologically induced mineralization by bacteria, in: Dove, P.M., DeYoreo, J.J., Weiner, S. (Eds.), Biomineralization. Mineralogical Soc America, Washington, pp. 95–114.

Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., Johnson, M.S., Taylor, B.L., 1997. Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria. Biophys. J. 73, 994–1000. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78132-3

Fuchs, G., 2011. Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life? Annu Rev Microbiol 65, 631–658. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102801

Gabora, L., 2013. Convergent Evolution, in: Maloy, S., Hughes, K. (Eds.), Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). Academic Press, San Diego, pp. 178–180. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00336-3

Gadd, G.M., 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology-(UK) 156, 609–643. https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0

Gaëtan, J., Halary, S., Millet, M., Bernard, C., Duval, C., Hamlaoui, S., Hecquet, A., Gugger, M., Marie, B., Mehta, N., Moreira, D., Skouri-Panet, F., Travert, C., Duprat, E., Leloup, J., Benzerara, K., 2022. Widespread formation of intracellular calcium carbonates by the bloom-forming cyanobacterium Microcystis. Environmental Microbiology n/a. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16322

Gal, A., Sviben, S., Wirth, R., Schreiber, A., Lassalle-Kaiser, B., Faivre, D., Scheffel, A., 2017. Trace-Element Incorporation into Intracellular Pools Uncovers Calcium-Pathways in a Coccolithophore. Adv Sci (Weinh) 4, 1700088. https://doi.org/10.1002/advs.201700088

Gallagher, K.L., Kading, T.J., Braissant, O., Dupraz, C., Visscher, P.T., 2012. Inside the alkalinity engine: the role of electron donors in the organomineralization potential of sulfate-reducing bacteria. Geobiology 10, 518–530. https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2012.00342.x

García G, M., Márquez G, M.A., Moreno H, C.X., 2016. Characterization of bacterial diversity associated with calcareous deposits and drip-waters, and isolation of calcifying bacteria from two Colombian mines. Microbiol Res 182, 21–30. https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.006

Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T., 2005. Class I. Alphaproteobacteria class. nov., in: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Springer US, Boston, MA, pp. 1–574. https://doi.org/10.1007/0-387-29298-5_1

Geelhoed, J.S., Kleerebezem, R., Sorokin, D.Y., Stams, A.J.M., van Loosdrecht, M.C.M., 2010. Reduced inorganic sulfur oxidation supports autotrophic and mixotrophic growth of Magnetospirillum strain J10 and Magnetospirillum gryphiswaldense. Environ. Microbiol. 12, 1031–1040. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02148.x

George, D.M., Vincent, A.S., Mackey, H.R., 2020. An overview of anoxygenic phototrophic bacteria and their applications in environmental biotechnology for sustainable Resource recovery. Biotechnol Rep (Amst) 28, e00563. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00563

Glöckner, F.O., Babenzien, H.-D., Wulf, J., Amann, R., 1999. Phylogeny and Diversity of Achromatium oxaliferum. Systematic and Applied Microbiology 22, 28–38. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80025-3

Gong, F., Cai, Z., Li, Y., 2016. Synthetic biology for CO2 fixation. Science China. Life sciences 59. https://doi.org/10.1007/s11427-016-0304-2

Gorby, Y.A., Beveridge, T.J., Blakemore, R.P., 1988. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. J. Bacteriol. 170, 834–841.

Görgen, S., Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Gugger, M., Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C., 2020. The diversity of molecular mechanisms of carbonate biomineralization by bacteria. Discov Mater 1, 2. https://doi.org/10.1007/s43939-020-00001-9

Gorlas, A., Jacquemot, P., Guigner, J.-M., Gill, S., Forterre, P., Guyot, F., 2018. Greigite nanocrystals produced by hyperthermophilic archaea of Thermococcales order. PLOS ONE 13, e0201549. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201549

Goswami, P., He, K., Li, J., Pan, Y., Roberts, A.P., Lin, W., 2022b. Magnetotactic bacteria and magnetofossils: ecology, evolution and environmental implications. NPJ Biofilms Microbiomes 8, 43. https://doi.org/10.1038/s41522-022-00304-0

Grabovich, M.Y., Dubinina, G.A., Churikova, V.V., Churikov, S.N., Korovina, T.I., 1995. Mechanisms of synthesis and utilization of oxalate inclusions in the colorless sulfur bacterium Macromonas bipunctata. Microbiology (N.Y., NY) 64, 536–542.

Grant, C.R., Wan, J., Komeili, A., 2018. Organelle Formation in Bacteria and Archaea. Annual Review of Cell and Developmental Biology 34, 217–238. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060908

Gray, N., Head, I., 2014. The Family Achromatiaceae, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), The Prokaryotes: Gammaproteobacteria. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–14. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_406

Gray, N.D., 2006. The Unique Role of Intracellular Calcification in the Genus Achromatium, in: Shively, J.M. (Ed.), Inclusions in Prokaryotes, Microbiology Monographs. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 299–309. https://doi.org/10.1007/3-540-33774-1_11

Gray, N.D., Comaskey, D., Miskin, I.P., Pickup, R.W., Suzuki, K., Head, I.M., 2004. Adaptation of sympatric Achromatium spp. to different redox conditions as a mechanism for coexistence of functionally similar sulphur bacteria. Environ. Microbiol. 6, 669–677. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00607.x

Gray, N.D., Howarth, R., Pickup, R.W., Jones, J.G., Head, I.M., 2000. Use of Combined Microautoradiography and Fluorescence In Situ Hybridization To Determine Carbon Metabolism in Mixed Natural Communities of Uncultured Bacteria from the GenusAchromatium. Applied and Environmental Microbiology 66, 4518–4522. https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4518-4522.2000

Gray, N.D., Howarth, R., Pickup, R.W., Jones, J.G., Head, I.M., 1999a. Substrate uptake by uncultured bacteria from the genus Achromatium determined by microautoradiography. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5100–5106.
Gray, N.D., Howarth, R., Rowan, A., Pickup, R.W., Jones, J.G., Head, I.M., 1999b. Natural communities of Achromatium oxaliferum comprise genetically, morphologically, and ecologically distinct subpopulations. Appl Environ Microbiol 65, 5089–5099. https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.5089-5099.1999
Gray, N.D., Pickup, R.W., Jones, J.G., Head, I.M., 1997. Ecophysiological Evidence that Achromatium oxaliferum Is Responsible for the Oxidation of Reduced Sulfur Species to Sulfate in a Freshwater Sediment. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1905–1910.
Gregersen, L., Bryant, D., Frigaard, N.-U., 2011. Mechanisms and Evolution of Oxidative Sulfur Metabolism in Green Sulfur Bacteria. Frontiers in Microbiology 2.
Grünberg, K., Müller, E.-C., Otto, A., Reszka, R., Linder, D., Kube, M., Reinhardt, R., Schüler, D., 2004. Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in Magnetospirillum gryphiswaldense. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1040–1050.
Grünberg, K., Wawer, C., Tebo, B.M., Schüler, D., 2001. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4573–4582.
Guo, Q., Zhou, Z., Zhang, L., Zhang, C., Chen, M., Wang, B., Lin, M., Wang, W., Zhang, W., Li, X., 2020. Skermanella pratensis sp. nov., isolated from meadow soil, and emended description of the genus Skermanella. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 70, 1605–1609. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003944
Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41, 95–98.
Hallberg, R., Ferris, F.G., 2004. Biomineralization by Gallionella. Geomicrobiology Journal 21, 325–330. https://doi.org/10.1080/01490450490454001
Head, I., Gray, N., Babenzien, H., Oliver Glöckner, F., 2000. Uncultured giant sulfur bacteria of the genus Achromatium. FEMS Microbiol. Ecol. 33, 171–180. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00739.x
Head, I.M., Gray, N.D., Clarke, K.J., Pickup, R.W., Jones, J.G., 1996. The phylogenetic position and ultrastructure of the uncultured bacterium Achromatium oxaliferum. Microbiology (Reading, Engl.) 142 (Pt 9), 2341–2354. https://doi.org/10.1099/00221287-142-9-2341
Head, I.M., Gray, N.D., Howarth, R., Pickup, R.W., Clarke, K.J., Jones, J.G., 2000. Achromatium oxaliferum Understanding the Unmistakable, in: Schink, B. (Ed.), Advances in Microbial Ecology, Advances in Microbial Ecology. Springer US, Boston, MA, pp. 1–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4187-5_1
Hemmersbach, R., Krause, M., Bräucker, R., Ivanova, K., 2005. Graviperception in ciliates: Steps in the transduction chain. Advances in Space Research, Space Life Sciences: Ground-Based Iron-Ion Biology and Physics, Including Shielding 35, 296–299. https://doi.org/10.1016/j.asr.2005.03.024
Herrero, A., Flores, E., 2008. The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution.
Herve, V., Clerc, M., Cailleau, G., Bueche, M., Junier, T., Verrecchia, E., Junier, P., 2018. Carbonate Accumulation in the Bark of Terminalia bellirica: A New Habitat for the Oxalate-Carbonate Pathway. Geomicrobiol. J. 35, 31–39. https://doi.org/10.1080/01490451.2017.1309087
Holt, J.G., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Lippincott Williams & Wilkins.

Horn, M.A., Drake, H.L., Schramm, A., 2006. Nitrous Oxide Reductase Genes (nosZ) of Denitrifying Microbial Populations in Soil and the Earthworm Gut Are Phylogenetically Similar. Appl Environ Microbiol 72, 1019–1026. https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1019-1026.2006

Hu, Z.-Q., Wang, A.-M., Zhang, H.-F., 2017. Chapter 22 - Amorphous Materials, in: Xu, R., Xu, Y. (Eds.), Modern Inorganic Synthetic Chemistry (Second Edition). Elsevier, Amsterdam, pp. 641–667. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63591-4.00022-7

Huber, H., Gallenberger, M., Jahn, U., Eylert, E., Berg, I.A., Kockelkorn, D., Eisenreich, W., Fuchs, G., 2008. A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic Archaeum Ignicoccus hospitalis. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 7851–7856. https://doi.org/10.1073/pnas.0801043105

Iniesto, M., Moreira, D., Reboul, G., Deschamps, P., Benzerara, K., Bertolino, P., Saghaï, A., Tavera, R., López-García, P., 2021. Core microbial communities of lacustrine microbialites sampled along an alkalinity gradient. Environmental Microbiology 23, 51–68. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15252

Ionescu, D., Bizic-Ionescu, M., De Maio, N., Cypionka, H., Grossart, H.-P., 2017. Community-like genome in single cells of the sulfur bacterium Achromatium oxaliferum. Nature Communications 8, 455. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00342-9

Ionescu, D., Zoccarato, L., Zaduryan, A., Schorn, S., Bizic, M., Pinnow, S., Cypionka, H., Grossart, H.-P., 2020. Heterozygous, Polyploid, Giant Bacterium, Achromatium, Possesses an Identical Functional Inventory Worldwide across Drastically Different Ecosystems. Mol Biol Evol 38, 1040–1059. https://doi.org/10.1093/molbev/msaa273

Isambert, A., Menguy, N., Larquet, E., Guyot, F., Valet, J.-P., 2007. Transmission electron microscopy study of magnetites in a freshwater population of magnetotactic bacteria. American Mineralogist 92, 621–630. https://doi.org/10.2138/am.2007.2278

Jaffe, A.L., Bardot, C., Le Jeune, A.-H., Liu, J., Colombet, J., Perrière, F., Billard, H., Castelle, C.J., Lehours, A.-C., Banfield, J.F., 2023. Variable impact of geochemical gradients on the functional potential of bacteria, archaea, and phages from the permanently stratified Lac Pavin. Microbiome 11, 14. https://doi.org/10.1186/s40168-022-01416-7

Jansson, C., Northen, T., 2010. Calcifying cyanobacteria--the potential of biomineralization for carbon capture and storage. Curr Opin Biotechnol 21, 365–371. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.017

Jaquet, J.-M., Nirel, P., Martignier, A., 2013. Preliminary investigations on picoplankton-related precipitation of alkaline-earth metal carbonates in meso-oligotrophic lake Geneva (Switzerland). Journal of Limnology 72, e50–e50. https://doi.org/10.4081/jlimnol.2013.e50

Jézéquel, D., Michard, G., Viollier, E., Agrinier, P., Albéric, P., Lopes, F., Abril, G., Bergonzini, L., 2016. Carbon Cycle in a Meromictic Crater Lake: Lake Pavin, France, in: Sime-Ngando, T., Boivin, P., Chapron, E., Jezequel, D., Meybeck, M. (Eds.), Lake Pavin: History, Geology, Biogeochemistry, and Sedimentology of a Deep Meromictic Maar Lake. Springer International Publishing, Cham, pp. 185–203. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39961-4_11

Jogler, C., Schüler, D., 2007. Genetic and Biochemical Analysis of Magnetosome Formation in Magnetospirillum gryphiswaldense, in: Handbook of Biomineralization. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 145–161. https://doi.org/10.1002/9783527619443.ch9

Johnsen, S., Lohmann, K.J., 2008. Magnetoreception in animals. Physics Today 61, 29–35. https://doi.org/10.1063/1.2897947

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., Jermiin, L.S., 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nat. Methods 14, 587–589. https://doi.org/10.1038/nmeth.4285

Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., Tanabe, M., 2012. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. Nucleic Acids Res 40, D109-114. https://doi.org/10.1093/nar/gkr988

Karp, P.D., Paley, S.M., Krummenacker, M., Latendresse, M., Dale, J.M., Lee, T.J., Kaipa, P., Gilham, F., Spaulding, A., Popescu, L., Altman, T., Paulsen, I., Keseler, I.M., Caspi, R., 2010. Pathway Tools version 13.0: integrated software for pathway/genome informatics and systems biology. Brief Bioinform 11, 40–79. https://doi.org/10.1093/bib/bbp043

Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol. Biol. Evol. 30, 772–780. https://doi.org/10.1093/molbev/mst010

Keim, C.N., Solórzano, G., Farina, M., Lins, U., 2005. Intracellular inclusions of uncultured magnetotactic bacteria. Int. Microbiol. 8, 111–117.

Kenward, P.A., Goldstein, R.H., González, L.A., Roberts, J.A., 2009. Precipitation of low-temperature dolomite from an anaerobic microbial consortium: the role of methanogenic Archaea. Geobiology 7, 556–565. https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2009.00210.x

Keren, R., Mayzel, B., Lavy, A., Polishchuk, I., Levy, D., Fakra, S.C., Pokroy, B., Ilan, M., 2017. Sponge-associated bacteria mineralize arsenic and barium on intracellular vesicles. Nat Commun 8, 14393. https://doi.org/10.1038/ncomms14393

Keren-Paz, A., Brumfeld, V., Oppenheimer-Shaanan, Y., Kolodkin-Gal, I., 2018. Micro-CT X-ray imaging exposes structured diffusion barriers within biofilms. NPJ Biofilms Microbiomes 4, 8. https://doi.org/10.1038/s41522-018-0051-8

Keren-Paz, A., Kolodkin-Gal, I., 2020. A brick in the wall: Discovering a novel mineral component of the biofilm extracellular matrix. N Biotechnol 56, 9–15. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.11.002

Keren-Paz, A., Maan, H., Karunker, I., Olender, T., Kapishnikov, S., Dersch, S., Kartvelishvily, E., Wolf, S.G., Gal, A., Graumann, P.L., Kolodkin-Gal, I., 2022. The roles of intracellular and extracellular calcium in Bacillus subtilis biofilms. iScience 25, 104308. https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104308

Keshri, J., Pradeep Ram, A.S., Nana, P.A., Sime-Ngando, T., 2018. Taxonomical Resolution and Distribution of Bacterioplankton Along the Vertical Gradient Reveals Pronounced Spatiotemporal Patterns in Contrasted Temperate Freshwater Lakes. Microb Ecol 76, 372–386. https://doi.org/10.1007/s00248-018-1143-y

Khammas, K.M., Ageron, E., Grimont, P.A.D., Kaiser, P., 1989. Azospirillum irakense sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Research in Microbiology 140, 679–693. https://doi.org/10.1016/0923-2508(89)90199-X

Kitadai, N., Nakamura, R., Yamamoto, M., Takai, K., Li, Y., Yamaguchi, A., Gilbert, A., Ueno, Y., Yoshida, N., Oono, Y., 2018. Geoelectrochemical CO production: Implications for the autotrophic origin of life. Sci Adv 4, eaao7265. https://doi.org/10.1126/sciadv.aao7265

Kling, G.W., Clark, M.A., Wagner, G.N., Compton, H.R., Humphrey, A.M., Devine, J.D., Evans, W.C., Lockwood, J.P., Tuttle, M.L., Koenigsberg, E.J., 1987. The 1986 Lake Nyos Gas Disaster in Cameroon, West Africa. Science 236, 169–175. https://doi.org/10.1126/science.236.4798.169

Knoll, A., 2003. Biomineralization and Evolutionary History. Reviews in Mineralogy & Geochemistry - REV MINERAL GEOCHEM 54, 329–356. https://doi.org/10.2113/0540329

Kolinko, I., Lohße, A., Borg, S., Raschdorf, O., Jogler, C., Tu, Q., Pósfai, M., Tompa, E., Plitzko, J.M., Brachmann, A., Wanner, G., Müller, R., Zhang, Y., Schüler, D., 2014. Biosynthesis of magnetic nanostructures in a foreign organism by transfer of bacterial magnetosome gene clusters. Nat Nanotechnol 9, 193–197. https://doi.org/10.1038/nnano.2014.13

Kolinko, S., Jogler, C., Katzmann, E., Wanner, G., Peplies, J., Schüler, D., 2012. Single-cell analysis reveals a novel uncultivated magnetotactic bacterium within the candidate division OP3. Environ. Microbiol. 14, 1709–1721. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02609.x

Komeili, A., Li, Z., Newman, D.K., Jensen, G.J., 2006. Magnetosomes are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK. Science 311, 242–245. https://doi.org/10.1126/science.1123231

Konstantinidis, K.T., Tiedje, J.M., 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. Proceedings of the National Academy of Sciences 102, 2567–2572. https://doi.org/10.1073/pnas.0409727102

Koziaeva, V.V., Alekseeva, L.M., Uzun, M.M., Leão, P., Sukhacheva, M.V., Patutina, E.O., Kolganova, T.V., Grouzdev, D.S., 2020. Biodiversity of Magnetotactic Bacteria in the Freshwater Lake Beloe Bordukovskoe, Russia. Microbiology 89, 348–358. https://doi.org/10.1134/S002626172003008X

Krejci, M.R., Wasserman, B., Finney, L., McNulty, I., Legnini, D., Vogt, S., Joester, D., 2011. Selectivity in biomineralization of barium and strontium. Journal of Structural Biology 176, 192–202. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.08.006

Kuenen, J.G., 2008. Anammox bacteria: from discovery to application. Nat Rev Microbiol 6, 320–326. https://doi.org/10.1038/nrmicro1857

Kümpel, C., Grein, F., Dahl, C., 2023. Fluorescence Microscopy Study of the Intracellular Sulfur Globule Protein SgpD in the Purple Sulfur Bacterium Allochromatium vinosum. Microorganisms 11, 1792. https://doi.org/10.3390/microorganisms11071792

La Rivière, J.W.M., Schmidt, K., 2006. Morphologically Conspicuous Sulfur-Oxidizing Eubacteria, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), The Prokaryotes: Volume 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass. Springer, New York, NY, pp. 941–954. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_40

Lackey, J.B., Lackey, E.W., 1961. The Habitat and Description of a New Genus of Sulphur Bacterium. Microbiology 26, 29–39. https://doi.org/10.1099/00221287-26-1-29

Lane, D.J., 1991. 16S/23S sequencing, in: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley & Sons: New York, pp. 115–175.

Larralde, M., Zeller, G., 2023. PyHMMER: a Python library binding to HMMER for efficient sequence analysis. Bioinformatics 39, btad214. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad214

Lavina, P., Del Rosso, T., Rocher, P., W. Levi-FAICT, T., 2009. Le complexe volcanique « Montchal - Pavin – Montcineyre » ; nouvelles stratigraphie, téphrochronologie et datations, vers une réévaluation de l'aléa volcano-tectonique en Auvergne [WWW Document]. URL https://www.researchgate.net/publication/277376687_Le_complexe_volcanique_Montchal_-_Pavin_-_Montcineyre_nouvelles_stratigraphie_tephrochronologie_et_datations_vers_une_reevaluation_de_l%27alea_volcano-tectonique_en_Auvergne (accessed 8.7.23).

Leão, P., Nagard, L., Yuan, H., Cypriano, J., da Silva-Neto, I., Bazylinski, D., Acosta-Avalos, D., Barros, H., Hitchcock, A., Lins, U., Abreu, F., 2019. Magnetosome magnetite biomineralization in a flagellated protist: evidence for an early evolutionary origin

for magnetoreception in eukaryotes? Environmental Microbiology 22, 1495–1506. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14711

Lee, Y.-J., Prange, A., Lichtenberg, H., Rohde, M., Dashti, M., Wiegel, J., 2007. In Situ Analysis of Sulfur Species in Sulfur Globules Produced from Thiosulfate by Thermoanaerobacter sulfurigignens and Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes. J Bacteriol 189, 7525–7529. https://doi.org/10.1128/JB.00782-07

Lefèvre, C.T., Abreu, F., Schmidt, M.L., Lins, U., Frankel, R.B., Hedlund, B.P., Bazylinski, D.A., 2010. Moderately thermophilic magnetotactic bacteria from hot springs in Nevada. Appl. Environ. Microbiol. 76, 3740–3743. https://doi.org/10.1128/AEM.03018-09

Lefèvre, C.T., Bazylinski, D.A., 2013. Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 77, 497–526.

Lefèvre, C.T., Bennet, M., Landau, L., Vach, P., Pignol, D., Bazylinski, D.A., Frankel, R.B., Klumpp, S., Faivre, D., 2014. Diversity of magneto-aerotactic behaviors and oxygen sensing mechanisms in cultured magnetotactic bacteria. Biophys. J. 107, 527–538. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.043

Lefèvre, C.T., Frankel, R.B., Pósfai, M., Prozorov, T., Bazylinski, D.A., 2011. Isolation of obligately alkaliphilic magnetotactic bacteria from extremely alkaline environments. Environ. Microbiol. 13, 2342–2350. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02505.x

Lefèvre, C.T., Menguy, N., Abreu, F., Lins, U., Pósfai, M., Prozorov, T., Pignol, D., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., 2011a. A cultured greigite-producing magnetotactic bacterium in a novel group of sulfate-reducing bacteria. Science 334, 1720–1723. https://doi.org/10.1126/science.1212596

Lefèvre, C.T., Pósfai, M., Abreu, F., Lins, U., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., 2011b. Morphological features of elongated-anisotropic magnetosome crystals in magnetotactic bacteria of the Nitrospirae phylum and the Deltaproteobacteria class. Earth Planet. Sci. Lett. 312, 194–200. https://doi.org/10.1016/j.epsl.2011.10.003

Lefèvre, C.T., Schmidt, M.L., Viloria, N., Trubitsyn, D., Schüler, D., Bazylinski, D.A., 2012a. Insight into the evolution of magnetotaxis in Magnetospirillum spp., based on mam gene phylogeny. Appl. Environ. Microbiol. 78, 7238–7248. https://doi.org/10.1128/AEM.01951-12

Lefèvre, C.T., Trubitsyn, D., Abreu, F., Kolinko, S., Almeida, L.G.P., Vasconcelos, A.T.R., Lins, U., Schüler, D., Ginet, N., Pignol, D., Bazylinski, D.A., 2013a. Monophyletic origin of magnetotaxis and the first magnetosomes. Environmental Microbiology 15, 2267–2274. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12097

Lefèvre, C.T., Trubitsyn, D., Abreu, F., Kolinko, S., Jogler, C., de Almeida, L.G.P., de Vasconcelos, A.T.R., Kube, M., Reinhardt, R., Lins, U., Pignol, D., Schüler, D., Bazylinski, D.A., Ginet, N., 2013b. Comparative genomic analysis of magnetotactic bacteria from the Deltaproteobacteria provides new insights into magnetite and greigite magnetosome genes required for magnetotaxis. Environmental Microbiology 15, 2712–2735. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12128

Lefèvre, C.T, Viloria, N., Schmidt, M.L., Pósfai, M., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., 2012. Novel magnetite-producing magnetotactic bacteria belonging to the Gammaproteobacteria. ISME J 6, 440–450. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.97

Lehours, A.-C., Bardot, C., Thenot, A., Debroas, D., Fonty, G., 2005. Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique meromictic lake in France. Appl Environ Microbiol 71, 7389–7400. https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7389-7400.2005

Lehours, A.-C., Borrel, G., Morel-Desrosiers, N., Bardot, C., Grossi, V., Kéraval, B., Attard, E., Morel, J.-P., Amblard, C., Fonty, G., 2016. Anaerobic Microbial Communities and Processes Involved in the Methane Cycle in Freshwater Lakes-a Focus on Lake Pavin, in: Lake Pavin: History, Geology, Biogeochemistry, and Sedimentology of a Deep Meromictic Maar Lake. pp. 255–284. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39961-4_16

Lehours, A.-C., Evans, P., Bardot, C., Joblin, K., Gérard, F., 2007. Phylogenetic Diversity of Archaea and Bacteria in the Anoxic Zone of a Meromictic Lake (Lake Pavin, France). Appl. Environ. Microbiol. 73, 2016–2019. https://doi.org/10.1128/AEM.01490-06

Lepère, C., Boucher, D., Jardillier, L., Domaizon, I., Debroas, D., 2006. Succession and Regulation Factors of Small Eukaryote Community Composition in a Lacustrine Ecosystem (Lake Pavin). Applied and Environmental Microbiology 72, 2971–2981. https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2971-2981.2006

Lepère, C., Domaizon, I., Hugoni, M., Vellet, A., Debroas, D., 2016. Diversity and Dynamics of Active Small Microbial Eukaryotes in the Anoxic Zone of a Freshwater Meromictic Lake (Pavin, France). Frontiers in Microbiology 7.

Li, J., Ge, X., Zhang, X., Chen, G., Pan, Y., 2010. Recover vigorous cells of Magnetospirillum magneticum AMB-1 by capillary magnetic separation. Chin. J. Ocean. Limnol. 28, 826–831. https://doi.org/10.1007/s00343-010-9068-4

Li, J., Liu, P., Tamaxia, A., Zhang, H., Liu, Y., Wang, J., Menguy, N., Zhao, X., Roberts, A.P., Pan, Y., 2021. Diverse Intracellular Inclusion Types Within Magnetotactic Bacteria: Implications for Biogeochemical Cycling in Aquatic Environments. Journal of Geophysical Research: Biogeosciences 126, e2021JG006310. https://doi.org/10.1029/2021JG006310

Li, J., Liu, P., Wang, J., Roberts, A.P., Pan, Y., 2020a. Magnetotaxis as an Adaptation to Enable Bacterial Shuttling of Microbial Sulfur and Sulfur Cycling Across Aquatic Oxic-Anoxic Interfaces. J. Geophys. Res.-Biogeosci. 125, e2020JG006012. https://doi.org/10.1029/2020JG006012

Li, J., Menguy, N., Leroy, E., Roberts, A.P., Liu, P., Pan, Y., 2020b. Biomineralization and Magnetism of Uncultured Magnetotactic Coccus Strain THC-1 With Non-chained Magnetosomal Magnetite Nanoparticles. Journal of Geophysical Research: Solid Earth 125, e2020JB020853. https://doi.org/10.1029/2020JB020853

Li, J., Menguy, N., Roberts, A.P., Gu, L., Leroy, E., Bourgon, J., Yang, X., Zhao, X., Liu, P., Changela, H.G., Pan, Y., 2020c. Bullet-Shaped Magnetite Biomineralization Within a Magnetotactic Deltaproteobacterium: Implications for Magnetofossil Identification. Journal of Geophysical Research: Biogeosciences 125, e2020JG005680. https://doi.org/10.1029/2020JG005680

Li, J., Oliver, I., Cam, N., Boudier, T., Blondeau, M., Leroy, E., Cosmidis, J., Skouri-Panet, F., Guigner, J.-M., Ferard, C., Poinsot, M., Moreira, D., Lopez-Garcia, P., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., Benzerara, K., 2016. Biomineralization Patterns of Intracellular Carbonatogenesis in Cyanobacteria: Molecular Hypotheses. Minerals 6, 10. https://doi.org/10.3390/min6010010

Light, T., García, M., Prairie, J.C., Martínez Ruiz, F., Norris, R., 2023. Water column barium sulfate dissolution and shielding by organic matter aggregates: Implications for the pelagic barite proxy. https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2023.121637

Lin, S.-Y., Hameed, A., Shen, F.-T., Liu, Y.-C., Hsu, Y.-H., Shahina, M., Lai, W.-A., Young, C.-C., 2014. Description of Niveispirillum fermenti gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of Azospirillum irakense (1989) as Niveispirillum irakense comb. nov., and reclassification of Azospirillum amazonense (1983) as Nitrospirillum amazonense gen. nov. Antonie Van Leeuwenhoek 105, 1149–1162. https://doi.org/10.1007/s10482-014-0176-6

Lin, W., Bazylinski, D.A., Xiao, T., Wu, L.-F., Pan, Y., 2014a. Life with compass: diversity and biogeography of magnetotactic bacteria. Environ. Microbiol. 16, 2646–2658. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12313

Lin, W., Deng, A., Wang, Z., Li, Y., Wen, T., Wu, L.-F., Wu, M., Pan, Y., 2014. Genomic insights into the uncultured genus 'Candidatus Magnetobacterium' in the phylum Nitrospirae. ISME J 8, 2463–2477. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.94

Lin, W., Kirschvink, J.L., Paterson, G.A., Bazylinski, D.A., Pan, Y., 2020a. On the origin of microbial magnetoreception. National Science Review 7, 472–479. https://doi.org/10.1093/nsr/nwz065

Lin, W., Pan, Y., Bazylinski, D.A., 2017a. Diversity and ecology of and biomineralization by magnetotactic bacteria. Environ Microbiol Rep 9, 345–356. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12550

Lin, W., Paterson, G.A., Zhu, Q., Wang, Y., Kopylova, E., Li, Y., Knight, R., Bazylinski, D.A., Zhu, R., Kirschvink, J.L., Pan, Y., 2017. Origin of microbial biomineralization and magnetotaxis during the Archean. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114, 2171–2176. https://doi.org/10.1073/pnas.1614654114

Lin, W., Zhang, W., Paterson, G.A., Zhu, Q., Zhao, X., Knight, R., Bazylinski, D.A., Roberts, A.P., Pan, Y., 2020b. Expanding magnetic organelle biogenesis in the domain Bacteria. Microbiome 8, 152. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00931-9

Lin, W., Zhang, W., Zhao, X., Roberts, A.P., Paterson, G.A., Bazylinski, D.A., Pan, Y., 2018. Genomic expansion of magnetotactic bacteria reveals an early common origin of magnetotaxis with lineage-specific evolution. ISME J 12, 1508–1519. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0098-9

Lindsay, M.R., Webb, R.I., Strous, M., Jetten, M.S., Butler, M.K., Forde, R.J., Fuerst, J.A., 2001. Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. Arch Microbiol 175, 413–429. https://doi.org/10.1007/s002030100280

Liu, P., Liu, Y., Ren, X., Zhang, Z., Zhao, X., Roberts, A.P., Pan, Y., Li, J., 2021. A Novel Magnetotactic Alphaproteobacterium Producing Intracellular Magnetite and Calcium-Bearing Minerals. Appl Environ Microbiol 87, e0155621. https://doi.org/10.1128/AEM.01556-21

Liu, Z., Zhang, Y., Fa, K., Zhao, H., Qin, S., Yan, R., Wu, B., 2018. Desert soil bacteria deposit atmospheric carbon dioxide in carbonate precipitates. CATENA 170, 64–72. https://doi.org/10.1016/j.catena.2018.06.001

Lohsse, A., Ullrich, S., Katzmann, E., Borg, S., Wanner, G., Richter, M., Voigt, B., Schweder, T., Schüler, D., 2011. Functional analysis of the magnetosome island in Magnetospirillum gryphiswaldense: the mamAB operon is sufficient for magnetite biomineralization. PLoS ONE 6, e25561. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025561

Long, M., Liu, J., Chen, Z., Bleijlevens, B., Roseboom, W., Albracht, S.P.J., 2007. Characterization of a HoxEFUYH type of [NiFe] hydrogenase from Allochromatium vinosum and some EPR and IR properties of the hydrogenase module. J Biol Inorg Chem 12, 62–78. https://doi.org/10.1007/s00775-006-0162-1

Lopes, F., Michard, G., Poulin, M., Roue, A., Prevot, F., Jézéquel, D., Viollier, E., 2010. Biogeochemical Modelling of a Seasonally Anoxic Lake: Calibration of Successive and Competitive Pathways and Processes in Lake Aydat, France. Aquatic Geochemistry 587. https://doi.org/10.1007/s10498-010-9095-y

Lopes, F., Viollier, E., Thiam, A., Michard, G., Abril, G., Groleau, A., Prevot, F., Carrias, J.-F., Alberic, P., Jezequel, D., 2011. Biogeochemical modelling of anaerobic vs. aerobic methane oxidation in a meromictic crater lake (Lake Pavin, France). Appl. Geochem. 26, 1919–1932. https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.06.021

Lowenstam, H.A., 1981. Minerals formed by organisms. Science 211, 1126–1131. https://doi.org/10.1126/science.7008198
Lower, B.H., Bazylinski, D.A., 2013. The Bacterial Magnetosome: A Unique Prokaryotic Organelle. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 23, 63–80. https://doi.org/10.1159/000346543
Lutkenhaus, J., 2012. The ParA/MinD family puts things in their place. Trends in microbiology 20, 411. https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.05.002
Macek, M., Pestová, D., Martínez Pérez, M.E., 2008. Seasonal and spatial dynamics of a ciliate assemblage in a warm-monomictic Lake Alchichica (Puebla, Mexico). Hidrobiológica 18, 25–35.
Madigan, M. T, Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., Stahl, D. A., 2022. Brock Biology of Microorganisms 16 edn.
Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 3140–3145.
Maki, J.S., 2013. Bacterial Intracellular Sulfur Globules: Structure and Function. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 23, 270–280. https://doi.org/10.1159/000351335
Mann, S., 2003. Mineralization in biological systems, in: Inorganic Elements in Biochemistry. https://doi.org/10.1007/BFb0111320
Mansor, M., Hamilton, T.L., Fantle, M.S., Macalady, J.L., 2015. Metabolic diversity and ecological niches of Achromatium populations revealed with single-cell genomic sequencing. Front Microbiol 6, 822. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00822
Mansor, M., Xu, J., 2020. Benefits at the nanoscale: a review of nanoparticle-enabled processes favouring microbial growth and functionality. Environ Microbiol 22, 3633–3649. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15174
Marakeby, H., Badr, E., Torkey, H., Song, Y., Leman, S., Monteil, C.L., Heath, L.S., Vinatzer, B.A., 2014. A system to automatically classify and name any individual genome-sequenced organism independently of current biological classification and nomenclature. PLoS One 9, e89142. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089142
Mardis, E.R., 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends Genet 24, 133–141. https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.12.007
Margolin, W., 2005. FTSZ AND THE DIVISION OF PROKARYOTIC CELLS AND ORGANELLES. Nat Rev Mol Cell Biol 6, 862–871. https://doi.org/10.1038/nrm1745
Maróti, J., Farkas, A., Nagy, I.K., Maróti, G., Kondorosi, É., Rákhely, G., Kovács, K.L., 2010. A Second Soluble Hox-Type NiFe Enzyme Completes the Hydrogenase Set in Thiocapsa roseopersicina BBS. Appl Environ Microbiol 76, 5113–5123. https://doi.org/10.1128/AEM.00351-10
Martignier, A., Filella, M., Pollok, K., Melkonian, M., Bensimon, M., Barja, F., Langenhorst, F., Jaquet, J.-M., Ariztegui, D., 2018. Marine and freshwater micropearls: Biomineralization producing strontium-rich amorphous calcium carbonate inclusions is widespread in the genus Tetraselmis (Chlorophyta). Biogeosciences Discussions 1–22. https://doi.org/10.5194/bg-2018-202
Martignier, A., Pacton, M., Filella, M., Jaquet, J.-M., Barja, F., Pollok, K., Langenhorst, F., Lavigne, S., Guagliardo, P., Kilburn, M.R., Thomas, C., Martini, R., Ariztegui, D., 2017. Intracellular amorphous carbonates uncover a new biomineralization process in eukaryotes. Geobiology 15, 240–253. https://doi.org/10.1111/gbi.12213

Matsunaga, T., Sakaguchi, T., Tadakoro, F., 1991. Magnetite formation by a magnetic bacterium capable of growing aerobically. Appl Microbiol Biotechnol 35, 651–655. https://doi.org/10.1007/BF00169632

Matsuyama, M., 2004. Phylogenic status of a purple sulfur bacterium and its bloom in Lake Kaiike. Limnology 5, 95–101. https://doi.org/10.1007/s10201-004-0119-4

Matsuyama, M., 2002. Disturbance of *Chromatium* Population at Mid-depth of Lake Kaiike. Microbes and Environments 17, 134–138. https://doi.org/10.1264/jsme2.17.134

Matsuyama, M., 1992. CaCO₃-Inclusions of Macromonas sp. Blooming at an Upper Boundary of the H₂S Layer of Lake Kaiike. Japanese Journal of Limnology (Rikusuigaku Zasshi) 53, 27–33. https://doi.org/10.3739/rikusui.53.27

Matsuyama, M., 1991. Enrichment of Macromonas sp. Densely Populating an Upper Boundary of the H₂S Layer of Lake Kaiike. Japanese Journal of Limnology (Rikusuigaku Zasshi) 52, 215–222. https://doi.org/10.3739/rikusui.52.215

McCollom, T.M., 2016. Abiotic methane formation during experimental serpentinization of olivine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113, 13965–13970. https://doi.org/10.1073/pnas.1611843113

McCool, G.J., Cannon, M.C., 2001. PhaC and PhaR Are Required for Polyhydroxyalkanoic Acid Synthase Activity in Bacillus megaterium. Journal of Bacteriology 183, 4235–4243. https://doi.org/10.1128/jb.183.14.4235-4243.2001

Médevielle, M., 2017. Utilisation de la bioprécipitation de carbonates de calcium pour améliorer la qualité de granulats de béton recyclé (These de doctorat). Ecole centrale de Nantes.

Mehta, N., Benzerara, K., Kocar, B.D., Chapon, V., 2019. Sequestration of Radionuclides Radium-226 and Strontium-90 by Cyanobacteria Forming Intracellular Calcium Carbonates. Environ. Sci. Technol. 53, 12639–12647. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03982

Menzel, P., Ng, K.L., Krogh, A., 2016. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. Nat Commun 7, 11257. https://doi.org/10.1038/ncomms11257

Mesbah, N., Whitman, W., Mesbah, M., 2011. Determination of the G+C Content of Prokaryotes. Methods in Microbiology 38, 299–324. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00014-0

Meybeck, M., 2016. Dragons, Fairies, Miracles and Worship at Pavin and Other European Maar-Lakes, in: Sime-Ngando, T., Boivin, P., Chapron, E., Jezequel, D., Meybeck, M. (Eds.), Lake Pavin: History, Geology, Biogeochemistry, and Sedimentology of a Deep Meromictic Maar Lake. Springer International Publishing, Cham, pp. 53–79. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39961-4_3

Meyer, B., Kuever, J., 2007. Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using aprA as functional marker gene. Appl Environ Microbiol 73, 7664–7679. https://doi.org/10.1128/AEM.01272-07

Minh, B.Q., Schmidt, H.A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M.D., von Haeseler, A., Lanfear, R., 2020. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. Molecular Biology and Evolution 37, 1530–1534. https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015

Monchy, S., Sanciu, G., Jobard, M., Rasconi, S., Gerphagnon, M., Chabé, M., Cian, A., Meloni, D., Niquil, N., Christaki, U., Viscogliosi, E., Sime-Ngando, T., 2011. Exploring and quantifying fungal diversity in freshwater lake ecosystems using rDNA cloning/sequencing and SSU tag pyrosequencing. Environmental Microbiology 13, 1433–1453. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02444.x

Monteil, C.L., Benzerara, K., Menguy, N., Bidaud, C.C., Michot-Achdjian, E., Bolzoni, R., Mathon, F.P., Coutaud, M., Alonso, B., Garau, C., Jézéquel, D., Viollier, E., Ginet, N., Floriani, M., Swaraj, S., Sachse, M., Busigny, V., Duprat, E., Guyot, F., Lefevre, C.T., 2021. Intracellular amorphous Ca-carbonate and magnetite biomineralization by a magnetotactic bacterium affiliated to the Alphaproteobacteria. ISME J 15, 1–18. https://doi.org/10.1038/s41396-020-00747-3

Monteil, C.L., Grouzdev, D.S., Perrière, G., Alonso, B., Rouy, Z., Cruveiller, S., Ginet, N., Pignol, D., Lefevre, C.T., 2020. Repeated horizontal gene transfers triggered parallel evolution of magnetotaxis in two evolutionary divergent lineages of magnetotactic bacteria. The ISME Journal 14, 1783–1794. https://doi.org/10.1038/s41396-020-0647-x

Monteil, C.L., Lefevre, C.T., 2020. Magnetoreception in Microorganisms. Trends in Microbiology 28, 266–275. https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.10.012

Monteil, C.L., Perrière, G., Menguy, N., Ginet, N., Alonso, B., Waisbord, N., Cruveiller, S., Pignol, D., Lefèvre, C.T., 2018. Genomic study of a novel magnetotactic Alphaproteobacteria uncovers the multiple ancestry of magnetotaxis. Environmental Microbiology 20, 4415–4430.

Monteil, C.L., Vallenet, D., Menguy, N., Benzerara, K., Barbe, V., Fouteau, S., Cruaud, C., Floriani, M., Viollier, E., Adryanczyk, G., Leonhardt, N., Faivre, D., Pignol, D., López-García, P., Weld, R.J., Lefevre, C.T., 2019. A symbiotic origin of magnetoreception in unicellular eukaryotes. Nat Microbiol 4, 1088–1095. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0432-7

Moreira, D., Tavera, R., Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Couradeau, E., Gérard, E., Loussert-Fonta, C., Novelo, E., Zivanovic, Y., Lopez-Garcia, P., 2016. Description of Gloeomargarita lithophora gen. nov., sp. nov., a thylakoid-bearing basal-branching cyanobacterium with intracellular carbonates, and proposal for Gloeomargaritales ord. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology 67. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001679

Moyer, C.L., Dobbs, F.C., Karl, D.M., 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. Applied and Environmental Microbiology 60, 871–879. https://doi.org/10.1128/aem.60.3.871-879.1994

Muchowska, K.B., Varma, S.J., Chevallot-Beroux, E., Lethuillier-Karl, L., Li, G., Moran, J., 2017. Metals promote sequences of the reverse Krebs cycle. Nat Ecol Evol 1, 1716–1721. https://doi.org/10.1038/s41559-017-0311-7

Müller, F.D., Raschdorf, O., Nudelman, H., Messerer, M., Katzmann, E., Plitzko, J.M., Zarivach, R., Schüler, D., 2014. The FtsZ-Like Protein FtsZm of Magnetospirillum gryphiswaldense Likely Interacts with Its Generic Homolog and Is Required for Biomineralization under Nitrate Deprivation. J Bacteriol 196, 650–659. https://doi.org/10.1128/JB.00804-13

Muñoz-Gómez, S.A., Hess, S., Burger, G., Lang, B.F., Susko, E., Slamovits, C.H., Roger, A.J., 2019. An updated phylogeny of the Alphaproteobacteria reveals that the parasitic Rickettsiales and Holosporales have independent origins. Elife 8, e42535. https://doi.org/10.7554/eLife.42535

Nakashima, S., Kebukawa, Y., Kitadai, N., Igisu, M., Matsuoka, N., 2018. Geochemistry and the Origin of Life: From Extraterrestrial Processes, Chemical Evolution on Earth, Fossilized Life's Records, to Natures of the Extant Life. Life (Basel) 8, 39. https://doi.org/10.3390/life8040039

Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. Mol Biol Evol 32, 268–274. https://doi.org/10.1093/molbev/msu300

Nguyen, N.-P., Warnow, T., Pop, M., White, B., 2016. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. npj Biofilms Microbiomes 2, 1–8. https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.4

Nie, W.-B., Ding, J., Xie, G.-J., Tan, X., Lu, Y., Peng, L., Liu, B.-F., Xing, D.-F., Yuan, Z., Ren, N., 2021. Simultaneous nitrate and sulfate dependent anaerobic oxidation of methane linking carbon, nitrogen and sulfur cycles. Water Research 194, 116928. https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116928

Nims, C., Cron, B., Wetherington, M., Macalady, J., Cosmidis, J., 2019. Low frequency Raman Spectroscopy for micron-scale and in vivo characterization of elemental sulfur in microbial samples. Sci Rep 9, 7971. https://doi.org/10.1038/s41598-019-44353-6

Nordmann, G.C., Hochstoeger, T., Keays, D.A., 2017. Magnetoreception—A sense without a receptor. PLOS Biology 15, e2003234. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003234

Nudelman, H., Valverde-Tercedor, C., Kolusheva, S., Perez Gonzalez, T., Widdrat, M., Grimberg, N., Levi, H., Nelkenbaum, O., Davidov, G., Faivre, D., Jimenez-Lopez, C., Zarivach, R., 2016. Structure-function studies of the magnetite-biomineralizing magnetosome-associated protein MamC. J Struct Biol 194, 244–252. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.03.001

Obst, M., Wehrli, B., Dittrich, M., 2009. CaCO3 nucleation by cyanobacteria: laboratory evidence for a passive, surface-induced mechanism. Geobiology 7, 324–347. https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2009.00200.x

Ona-Nguema, G., Abdelmoula, M., Jorand, F., Benali, O., Géhin, A., Block, J.-C., Génin, J.-M.R., 2002. Iron(II,III) hydroxycarbonate green rust formation and stabilization from lepidocrocite bioreduction. Environ Sci Technol 36, 16–20. https://doi.org/10.1021/es0020456

Orlova, M.V., Tarlachkov, S.V., Dubinina, G.A., Belousova, E.V., Tutukina, M.N., Grabovich, M.Y., 2016. Genomic insights into metabolic versatility of a lithotrophic sulfur-oxidizing diazotrophic Alphaproteobacterium Azospirillum thiophilum. FEMS Microbiol Ecol 92, fiw199. https://doi.org/10.1093/femsec/fiw199

Pan, P., Gu, Y., Sun, D.-L., Wu, Q.L., Zhou, N.-Y., 2023. Microbial Diversity Biased Estimation Caused by Intragenomic Heterogeneity and Interspecific Conservation of 16S rRNA Genes. Applied and Environmental Microbiology 89, e02108-22. https://doi.org/10.1128/aem.02108-22

Pandey, R., Usui, K., Livingstone, R.A., Fischer, S.A., Pfaendtner, J., Backus, E.H.G., Nagata, Y., Fröhlich-Nowoisky, J., Schmüser, L., Mauri, S., Scheel, J.F., Knopf, D.A., Pöschl, U., Bonn, M., Weidner, T., 2016. Ice-nucleating bacteria control the order and dynamics of interfacial water. Sci Adv 2, e1501630. https://doi.org/10.1126/sciadv.1501630

Paoli, G.C., Morgan, N.S., Tabita, F.R., Shively, J.M., 1995. Expression of the cbbLcbbS and cbbM genes and distinct organization of the cbb Calvin cycle structural genes of Rhodobacter capsulatus. Arch Microbiol 164, 396–405.

Park, Y., Eyal, Z., Pekker, P., Chevrier, D.M., Lefèvre, C.T., Arnoux, P., Armengaud, J., Monteil, C.L., Gal, A., Pósfai, M., Faivre, D., 2022. Periplasmic Bacterial Biomineralization of Copper Sulfide Nanoparticles. Adv Sci (Weinh) 9, 2203444. https://doi.org/10.1002/advs.202203444

Park, Y., Faivre, D., 2021. Diversity of Microbial Metal Sulfide Biomineralization. Chempluschem. https://doi.org/10.1002/cplu.202100457

Parks, D., Chuvochina, M., Waite, D., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P.-A., Philip, H., 2018. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. Nature Biotechnology 36. https://doi.org/10.1038/nbt.4229

Parks, D.H., Chuvochina, M., Waite, D.W., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P.-A., Hugenholtz, P., 2018. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. Nat. Biotechnol. 36, 996–1004. https://doi.org/10.1038/nbt.4229

Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Res. 25, 1043–1055. https://doi.org/10.1101/gr.186072.114

Parte, A.C., 2014. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. Nucleic Acids Res 42, D613–D616. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1111

Paul, J., Peryt, T., Burne, R., 2011. Kalkowsky's Stromatolites and Oolites (Lower Buntsandstein, Northern Germany), in: Lecture Notes in Earth Sciences. pp. 13–28. https://doi.org/10.1007/978-3-642-10415-2_2

Pelsma, K.A.J., van Helmond, N.A.G.M., Lenstra, W.K., Röckmann, T., Jetten, M.S.M., Slomp, C.P., Welte, C.U., 2023. Anaerobic methanotrophy is stimulated by graphene oxide in a brackish urban canal sediment. Environmental Microbiology n/a. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16501

Pernthaler, J., Glockner, F.O., Schonhuber, W., Amann, R., 2001. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. Methods in Microbiology, Vol 30 30, 207–226. https://doi.org/10.1016/S0580-9517(01)30046-6

Pfeiffer, D., Herz, J., Schmiedel, J., Popp, F., Schüler, D., 2020. Spatiotemporal Organization of Chemotaxis Pathways in Magnetospirillum gryphiswaldense. Appl Environ Microbiol 87. https://doi.org/10.1128/AEM.02229-20

Phoenix, V.R., Konhauser, K.O., 2008. Benefits of bacterial biomineralization. Geobiology 6, 303–308. https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2008.00147.x

Pikuta, E.V., Hoover, R.B., Bej, A.K., Marsic, D., Whitman, W.B., Cleland, D., Krader, P., 2003. Desulfonatronum thiodismutans sp. nov., a novel alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium capable of lithoautotrophic growth. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1327–1332.

Pilátová, J., Tashyreva, D., Týč, J., Vancová, M., Bokhari, S.N.H., Skoupý, R., Klementová, M., Küpper, H., Mojzeš, P., Lukeš, J., 2022. Massive accumulation of strontium and barium in diplonemid protists. https://doi.org/10.1101/2022.06.27.497835

Pizzorusso, A.C., 2021. Miraculous milk caves (Lattaie) of Italy. Carbonates Evaporites 36, 75. https://doi.org/10.1007/s13146-021-00735-4

Popall, R.M., Bolhuis, H., Muyzer, G., Sánchez-Román, M., 2020. Stromatolites as Biosignatures of Atmospheric Oxygenation: Carbonate Biomineralization and UV-C Resilience in a Geitlerinema sp. - Dominated Culture. Frontiers in Microbiology 11.

Popall, R.M., Postec, A., Lecoeuvre, A., Quéméneur, M., Erauso, G., 2023. Metabolic challenges and key players in serpentinite-hosted microbial ecosystems. Frontiers in Microbiology 14.

Prange, A., Engelhardt, H., Trüper, H.G., Dahl, C., 2004. The role of the sulfur globule proteins of Allochromatium vinosum: mutagenesis of the sulfur globule protein genes and expression studies by real-time RT-PCR. Arch Microbiol 182, 165–174. https://doi.org/10.1007/s00203-004-0683-3

Prinzi, A.M., Moore, N.M., 2023. Change of Plans: Overview of Bacterial Taxonomy, Recent Changes of Medical Importance, and Potential Areas of Impact. Open Forum Infectious Diseases 10, ofad269. https://doi.org/10.1093/ofid/ofad269

Qin, W., Wang, C., Ma, Y., Shen, M., Li, J., Jiao, K., Tay, F.R., Niu, L., 2020. Microbe-Mediated Extracellular and Intracellular Mineralization: Environmental, Industrial, and

Biotechnological Applications. Advanced Materials 32, 1907833. https://doi.org/10.1002/adma.201907833
Ragsdale, S.W., 2008. Enzymology of the Wood–Ljungdahl Pathway of Acetogenesis. Ann N Y Acad Sci 1125, 129–136. https://doi.org/10.1196/annals.1419.015
Rákhely, G., Laurinavichene, T.V., Tsygankov, A.A., Kovács, K.L., 2007. The role of Hox hydrogenase in the H2 metabolism of Thiocapsa roseopersicina. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Structure and Function of Photosystems 1767, 671–676. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2007.02.004
Rambaut, A., 2010. FigTree v1.3.1 [WWW Document]. URL http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/ (accessed 11.15.23).
Raven, J.A., Knoll, A.H., 2010. Non-Skeletal Biomineralization by Eukaryotes: Matters of Moment and Gravity. Geomicrobiology Journal 27, 572–584. https://doi.org/10.1080/01490451003702990
Riding, R., 2011. Microbialites, Stromatolites, and Thrombolites, in: Reitner, J., Thiel, V. (Eds.), Encyclopedia of Geobiology, Encyclopedia of Earth Sciences Series. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 635–654. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1_196
Rivas-Lamelo, S., Benzerara, K., Lefèvre, C., Monteil, C., Jézéquel, D., Menguy, N., Viollier, E., Guyot, F., Ferard, C., Poinsot, M., Skouri-Panet, F., Trcera, N., Miot, J., Duprat, E., 2017. Magnetotactic bacteria as a new model for P sequestration in the ferruginous Lake Pavin. Geochemical Perspectives Letters 5, 35–41. https://doi.org/10.7185/geochemlet.1743
Roberts, J.A., Kenward, P.A., Fowle, D.A., Goldstein, R.H., González, L.A., Moore, D.S., 2013. Surface chemistry allows for abiotic precipitation of dolomite at low temperature. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 14540–14545. https://doi.org/10.1073/pnas.1305403110
Rodgers, F.G., Blakemore, R.P., Blakemore, N.A., Frankel, R.B., Bazylinski, D.A., Maratea, D., Rodgers, C., 1990. Intercellular Structure in a Many-Celled Magnetotactic Prokaryote. Arch. Microbiol. 154, 18–22.
Ropp, R.C., 2013. Chapter 1 - The Alkaline Earths as Metals, in: Ropp, R.C. (Ed.), Encyclopedia of the Alkaline Earth Compounds. Elsevier, Amsterdam, pp. 1–23. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59550-8.00001-6
Sakaguchi, T., Arakaki, A., Matsunaga, T., 2002. Desulfovibrio magneticus sp nov., a novel sulfate-reducing bacterium that produces intracellular single-domain-sized magnetite particles. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 215–221.
Salehizadeh, H., Yan, N., Farnood, R., 2020. Recent advances in microbial CO2 fixation and conversion to value-added products. Chemical Engineering Journal 390, 124584. https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124584
Salman, V., Berben, T., Bowers, R.M., Woyke, T., Teske, A., Angert, E.R., 2016. Insights into the single cell draft genome of "Candidatus Achromatium palustre." Standards in Genomic Sciences 11, 28. https://doi.org/10.1186/s40793-016-0146-x
Salman, V., Yang, T., Berben, T., Klein, F., Angert, E., Teske, A., 2015. Calcite-accumulating large sulfur bacteria of the genus Achromatium in Sippewissett Salt Marsh. ISME J 9, 2503–2514. https://doi.org/10.1038/ismej.2015.62
Scheffel, A., Gruska, M., Faivre, D., Linaroudis, A., Plitzko, J.M., Schüler, D., 2006. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. Nature 440, 110–114. https://doi.org/10.1038/nature04382
Scheffel, A., Schüler, D., 2007. The acidic repetitive domain of the Magnetospirillum gryphiswaldense MamJ protein displays hypervariability but is not required for magnetosome chain assembly. J. Bacteriol. 189, 6437–6446. https://doi.org/10.1128/JB.00421-07
Schewiakoff W, 1893. Dber einen neuen bacterienahnlichen Organismus des Siisswassers.

Schleifer, K.H., Schüler, D., Spring, S., Weizenegger, M., Amann, R., Ludwig, W., Kohler, M., 1991. The genus Magnetospirillum gen. nov. description of Magnetospirillum gryphiswaldense sp. nov. and transfer of Aquaspirillum magnetotacticum to Magnetospirillum magnetotacticum comb. nov. Syst. Appl. Microbiol. 14, 379–385.

Schorn, S., Salman-Carvalho, V., Littmann, S., Ionescu, D., Grossart, H.-P., Cypionka, H., 2020. Cell Architecture of the Giant Sulfur Bacterium Achromatium oxaliferum: Extra-cytoplasmic Localization of Calcium Carbonate Bodies. FEMS Microbiol Ecol 96. https://doi.org/10.1093/femsec/fiz200

Schübbe, S., Kube, M., Scheffel, A., Wawer, C., Heyen, U., Meyerdierks, A., Madkour, M.H., Mayer, F., Reinhardt, R., Schüler, D., 2003. Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of Magnetospirillum gryphiswaldense reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island. J. Bacteriol. 185, 5779–5790.

Schulz-Vogt, H.N., Pollehne, F., Jürgens, K., Arz, H.W., Beier, S., Bahlo, R., Dellwig, O., Henkel, J.V., Herlemann, D.P.R., Krüger, S., Leipe, T., Schott, T., 2019. Effect of large magnetotactic bacteria with polyphosphate inclusions on the phosphate profile of the suboxic zone in the Black Sea. ISME J 13, 1198–1208. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0315-6

Schütz, K., Happe, T., Troshina, O., Lindblad, P., Leitão, E., Oliveira, P., Tamagnini, P., 2004. Cyanobacterial H(2) production -- a comparative analysis. Planta 218, 350–359. https://doi.org/10.1007/s00425-003-1113-5

Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30, 2068–2069. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153

Seyler, L.M., Brazelton, W.J., McLean, C., Putman, L.I., Hyer, A., Kubo, M.D.Y., Hoehler, T., Cardace, D., Schrenk, M.O., 2020. Carbon Assimilation Strategies in Ultrabasic Groundwater: Clues from the Integrated Study of a Serpentinization-Influenced Aquifer. mSystems 5, e00607-19. https://doi.org/10.1128/mSystems.00607-19

Silva, K.T., Abreu, F., Keim, C.N., Farina, M., Lins, U., 2008. Ultrastructure and cytochemistry of lipid granules in the many-celled magnetotactic prokaryote, "Candidatus Magnetoglobus multicellularis." Micron 39, 1387–1392. https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.05.009

Sime-Ngando, T., Bettarel, Y., Colombet, J., Palesse, S., Angia Sriram, P.R., Charpin, M., Amblard, C., 2016a. Lake Pavin: A Pioneer Site for Ecological Studies of Freshwater Viruses, in: Lake Pavin: History, Geology, Biogeochemistry, and Sedimentology of a Deep Meromictic Maar Lake. pp. 229–244. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39961-4_14

Sime-Ngando, T., Boivin, P., Chapron, E., Jezequel, D., Meybeck, M. (Eds.), 2016b. Lake Pavin: History, geology, biogeochemistry, and sedimentology of a deep meromictic maar lake. Springer International Publishing.

Simmons, S.L., Edwards, K.J., 2006. Geobiology of magnetotactic bacteria, in: Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria, Microbiology Monographs. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 77–102. https://doi.org/10.1007/7171_039

Siponen, M.I., Legrand, P., Widdrat, M., Jones, S.R., Zhang, W.-J., Chang, M.C.Y., Faivre, D., Arnoux, P., Pignol, D., 2013. Structural insight into magnetochrome-mediated magnetite biomineralization. Nature 502, 681–684. https://doi.org/10.1038/nature12573

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G., 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2. Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2.

Sorokin, D.Y., Trotsenko, Y.A., Doronina, N.V., Tourova, T.P., Galinski, E.A., Kolganova, T.V., Muyzer, G., 2007. Methylohalomonas lacus gen. nov., sp. nov. and Methylonatrum kenyense gen. nov., sp. nov., methylotrophic gammaproteobacteria from hypersaline lakes. Int J Syst Evol Microbiol 57, 2762–2769. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64955-0

Spadafora, A., Perri, E., Mckenzie, J.A., Vasconcelos, C., 2010. Microbial biomineralization processes forming modern Ca:Mg carbonate stromatolites. Sedimentology 57, 27–40. https://doi.org/10.1111/j.1365-3091.2009.01083.x

Spring, S., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Vangemerden, H., Petersen, N., 1993. Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a fresh-water sediment. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2397–2403.

Stackebrandt, E., Ebers, J., 2006. Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. Microbiol Today 8, 6–9.

STACKEBRANDT, E., GOEBEL, B.M., 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 44, 846–849. https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846

Su, Q., Andersen, H.R., Bazylinski, D.A., Jensen, M.M., 2023. Effect of oxic and anoxic conditions on intracellular storage of polyhydroxyalkanoate and polyphosphate in Magnetospirillum magneticum strain AMB-1. Frontiers in Microbiology 14.

Subhash, Y., Lee, S.-S., 2016. Skermanella rosea sp. nov., isolated from hydrocarbon-contaminated desert sands. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 66, 3951–3956. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001293

Sumper, M., Lehmann, G., 2006. Silica pattern formation in diatoms: species-specific polyamine biosynthesis. Chembiochem 7, 1419–1427. https://doi.org/10.1002/cbic.200600184

Tabita, F.R., 2009. The hydroxypropionate pathway of CO2 fixation: Fait accompli. Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 21015–21016. https://doi.org/10.1073/pnas.0912486107

Tan, G.-Y.A., Chen, C.-L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I.M.N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., Wang, J.-Y., 2014. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. Polymers 6, 706–754. https://doi.org/10.3390/polym6030706

Taoka, A., Kondo, J., Oestreicher, Z., Fukumori, Y., 2014. Characterization of uncultured giant rod-shaped magnetotactic Gammaproteobacteria from a freshwater pond in Kanazawa, Japan. Microbiology (Reading, Engl.) 160, 2226–2234. https://doi.org/10.1099/mic.0.078717-0

Tassi, F., Fazi, S., Rossetti, S., Pratesi, P., Ceccotti, M., Cabassi, J., Capecchiacci, F., Venturi, S., Vaselli, O., 2018. The biogeochemical vertical structure renders a meromictic volcanic lake a trap for geogenic CO2 (Lake Averno, Italy). PLoS One 13, e0193914. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193914

Taylor, B.L., Zhulin, I.B., Johnson, M.S., 1999. Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 53, 103–128. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.103

Tentori, E.F., Richardson, R.E., 2020. Methane Monooxygenase Gene Transcripts as Quantitative Biomarkers of Methanotrophic Activity in Methylosinus trichosporium OB3b. Appl Environ Microbiol 86, e01048-20. https://doi.org/10.1128/AEM.01048-20

Terzis, D., Laloui, L., 2018. 3-D micro-architecture and mechanical response of soil cemented via microbial-induced calcite precipitation. Sci Rep 8.

Tilak, K.V.B.R., Schneider, K., Schlegel, H.G., 1986. Autotrophic growth of nitrogen-fixingAzospirillum species and partial characterization of hydrogenase from strain CC. Current Microbiology 13, 291–297. https://doi.org/10.1007/BF01577194

Torres de Araujo, F.F., Pires, M.A., Frankel, R.B., Bicudo, C.E.M., 1986. Magnetite and magnetotaxis in algae. Biophys. J. 50, 375–378.

Trubitsyn, D., Geurink, C., Pikuta, E., Lefèvre, C.T., McShan, W.M., Gillaspy, A.F., Bazylinski, D.A., 2014. Draft Genome Sequence of the Obligately Alkaliphilic Sulfate-Reducing

Bacterium Desulfonatronum thiodismutans Strain MLF1. Genome Announc 2. https://doi.org/10.1128/genomeA.00741-14
Uebe, R., Ahrens, F., Stang, J., Jäger, K., Böttger, L.H., Schmidt, C., Matzanke, B.F., Schüler, D., 2019. Bacterioferritin of Magnetospirillum gryphiswaldense Is a Heterotetraeicosameric Complex Composed of Functionally Distinct Subunits but Is Not Involved in Magnetite Biomineralization. mBio 10, e02795-18. https://doi.org/10.1128/mBio.02795-18
Uebe, R., Schüler, D., 2016. Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. Nat Rev Microbiol 14, 621–637. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.99
Urashima, S., Nishioka, T., Yui, H., 2022. Micro-Raman spectroscopic analysis on natural carbonates: linear relations found via biaxial plotting of peak frequencies for cation substituted species. ANAL. SCI. 38, 921–929. https://doi.org/10.1007/s44211-022-00119-1
Uzun, M., Alekseeva, L., Krutkina, M., Koziaeva, V., Grouzdev, D., 2020. Unravelling the diversity of magnetotactic bacteria through analysis of open genomic databases. Scientific Data 7, 252. https://doi.org/10.1038/s41597-020-00593-0
Uzun, M., Koziaeva, V., Dziuba, M., Alekseeva, L., Krutkina, M., Sukhacheva, M., Baslerov, R., Grouzdev, D., 2023. Recovery and genome reconstruction of novel magnetotactic Elusimicrobiota from bog soil. ISME J 17, 204–214. https://doi.org/10.1038/s41396-022-01339-z
Uzun, M., Koziaeva, V., Dziuba, M., Leão, P., Krutkina, M., Grouzdev, D., 2022. Detection of interphylum transfers of the magnetosome gene cluster in magnetotactic bacteria. Frontiers in Microbiology 13.
Vallenet, D., Belda, E., Calteau, A., Cruveiller, S., Engelen, S., Lajus, A., Le Fèvre, F., Longin, C., Mornico, D., Roche, D., Rouy, Z., Salvignol, G., Scarpelli, C., Thil Smith, A.A., Weiman, M., Médigue, C., 2013. MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. Nucleic Acids Research 41, D636–D647. https://doi.org/10.1093/nar/gks1194
Vallenet, D., Calteau, A., Dubois, M., Amours, P., Bazin, A., Beuvin, M., Burlot, L., Bussell, X., Fouteau, S., Gautreau, G., Lajus, A., Langlois, J., Planel, R., Roche, D., Rollin, J., Rouy, Z., Sabatet, V., Médigue, C., 2020. MicroScope: an integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. Nucleic Acids Research 48, D579–D589. https://doi.org/10.1093/nar/gkz926
Vallenet, D., Engelen, S., Mornico, D., Cruveiller, S., Fleury, L., Lajus, A., Rouy, Z., Roche, D., Salvignol, G., Scarpelli, C., Médigue, C., 2009. MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. Database (Oxford) 2009, bap021. https://doi.org/10.1093/database/bap021
Vallenet, D., Labarre, L., Rouy, Z., Barbe, V., Bocs, S., Cruveiller, S., Lajus, A., Pascal, G., Scarpelli, C., Medigue, C., 2006. MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. Nucleic Acids Res. 34, 53–65. https://doi.org/10.1093/nar/gkj406
Van Grinsven, S., Sinninghe Damsté, J.S., Abdala Asbun, A., Engelmann, J.C., Harrison, J., Villanueva, L., 2020. Methane oxidation in anoxic lake water stimulated by nitrate and sulfate addition. Environmental Microbiology 22, 766–782. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14886
Vargas, G., Cypriano, J., Correa, T., Leão, P., Bazylinski, D.A., Abreu, F., 2018. Applications of Magnetotactic Bacteria, Magnetosomes and Magnetosome Crystals in Biotechnology and Nanotechnology: Mini-Review. Molecules 23. https://doi.org/10.3390/molecules23102438
Viollier, E., Jezequel, D., Michard, G., Pepe, M., Sarazin, G., Alberic, P., 1995. Geochemical Study of a Crater Lake (pavin Lake, France) - Trace-Element Behavior in the

Monimolimnion. Chem. Geol. 125, 61–72. https://doi.org/10.1016/0009-2541(95)00059-U
Viollier, E., Michard, G., Jézéquel, D., Pèpe, M., Sarazin, G., 1997. Geochemical study of a crater lake: Lake Pavin, Puy de Dôme, France. Constraints afforded by the particulate matter distribution in the element cycling within the lake. Chemical Geology 142, 225–241. https://doi.org/10.1016/S0009-2541(97)00093-4
Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., 2011. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Springer Science & Business Media.
Walsby, A.E., 1994. Gas vesicles. Microbiol. Rev. 58, 94–144.
Wan, J., Browne, P.J., Hershey, D.M., Montabana, E., Iavarone, A.T., Downing, K.H., Komeili, A., 2022a. A protease-mediated switch regulates the growth of magnetosome organelles in Magnetospirillum magneticum. Proc Natl Acad Sci U S A 119, e2111745119. https://doi.org/10.1073/pnas.2111745119
Wan, J., Monteil, C.L., Taoka, A., Ernie, G., Park, K., Amor, M., Taylor-Cornejo, E., Lefevre, C.T., Komeili, A., 2022b. McaA and McaB control the dynamic positioning of a bacterial magnetic organelle. Nat Commun 13, 5652. https://doi.org/10.1038/s41467-022-32914-9
Wang, D., Hamm, L.M., Bodnar, R.J., Dove, P.M., 2012. Raman spectroscopic characterization of the magnesium content in amorphous calcium carbonates. Journal of Raman Spectroscopy 43, 543–548. https://doi.org/10.1002/jrs.3057
Wang, S., Chen, Y., 2017. Origin of magnetotaxis: Vertical inheritance or horizontal transfer? PNAS 114, E5016–E5018. https://doi.org/10.1073/pnas.1706937114
Warren, L.A., Maurice, P.A., Parmar, N., Ferris, F.G., 2001. Microbially mediated calcium carbonate precipitation: Implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants. Geomicrobiol. J. 18, 93–115. https://doi.org/10.1080/01490450151079833
Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., Truper, H.G., 1987. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 37, 463–464. https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-463
Wei, H., Wang, M., Ya, M., Xu, C., 2022. The denitrifying anaerobic methane oxidation process and microorganisms in the environments: A review. Frontiers in Marine Science 9.
Weiner, S., Levi-Kalisman, Y., Raz, S., Addadi, L., 2003. Biologically Formed Amorphous Calcium Carbonate. Connective Tissue Research 44, 214–218. https://doi.org/10.1080/03008200390181681
Weissgerber, T., Sylvester, M., Kröninger, L., Dahl, C., 2014. A Comparative Quantitative Proteomic Study Identifies New Proteins Relevant for Sulfur Oxidation in the Purple Sulfur Bacterium Allochromatium vinosum. Applied and Environmental Microbiology 80, 2279–2292. https://doi.org/10.1128/AEM.04182-13
Wenter, R., Wanner, G., Schüler, D., Overmann, J., 2009. Ultrastructure, tactic behaviour and potential for sulfate reduction of a novel multicellular magnetotactic prokaryote from North Sea sediments. Environ. Microbiol. 11, 1493–1505. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01877.x
West, G.S., Griffiths, B.M., 1913. The Lime-Sulphur Bacteria of the Genus Hillhousia. Ann Bot os-27, 83–91. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a089453
Whiticar, M.J., 2020. The Biogeochemical Methane Cycle, in: Wilkes, H. (Ed.), Hydrocarbons, Oils and Lipids: Diversity, Origin, Chemistry and Fate, De. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–78. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54529-5_5-1

Whittenbury, R., Phillips, K.C., Wilkinson, J.F., 1970. Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria. Microbiology 61, 205–218. https://doi.org/10.1099/00221287-61-2-205

Wiedenheft, B., Mosolf, J., Willits, D., Yeager, M., Dryden, K.A., Young, M., Douglas, T., 2005. An archaeal antioxidant: Characterization of a Dps-like protein from Sulfolobus solfataricus. Proceedings of the National Academy of Sciences 102, 10551–10556. https://doi.org/10.1073/pnas.0501497102

Williams, T.J., Zhang, C.L., Scott, J.H., Bazylinski, D.A., 2006. Evidence for autotrophy via the reverse tricarboxylic acid cycle in the marine magnetotactic coccus strain MC-1. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1322–1329. https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1322-1329.2006

Wiltschko, R., Wiltschko, W., 2012. Magnetoreception. Adv Exp Med Biol 739, 126–141. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1704-0_8

Woese, C.R., Fox, G.E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, B.J., Stahl, D., 1975. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. Nature 254, 83–86. https://doi.org/10.1038/254083a0

Wolfe, R.S., Thauer, R.K., Pfennig, N., 1987. A 'capillary racetrack' method for isolation of magnetotactic bacteria. FEMS Microbiology Letters 45, 31–35. https://doi.org/10.1016/0378-1097(87)90039-5

Yang, T., Teske, A., Ambrose, W., Salman-Carvalho, V., Bagnell, R., Nielsen, L.P., 2019. Intracellular calcite and sulfur dynamics of Achromatium cells observed in a lab-based enrichment and aerobic incubation experiment. Antonie van Leeuwenhoek 112, 263–274. https://doi.org/10.1007/s10482-018-1153-2

Yang, Y., Cao, C., Gu, N., 2023. Identifying magnetosome-associated genes in the extended CtrA regulon in Magnetospirillum magneticum AMB-1 using a combinational approach. Briefings in Functional Genomics 22, 61–74. https://doi.org/10.1093/bfgp/elac039

Yin, X., Ziegler, A., Kelm, K., Hoffmann, R., Watermeyer, P., Alexa, P., Villinger, C., Rupp, U., Schlüter, L., Reusch, T.B.H., Griesshaber, E., Walther, P., Schmahl, W.W., 2018. Formation and mosaicity of coccolith segment calcite of the marine algae Emiliania huxleyi. J Phycol 54, 85–104. https://doi.org/10.1111/jpy.12604

Yuan, Fenghui, Wang, Y., Ricciuto, D.M., Shi, X., Yuan, Fengming, Hanson, P.J., Bridgham, S., Keller, J., Thornton, P.E., Xu, X., 2021. An Integrative Model for Soil Biogeochemistry and Methane Processes. II: Warming and Elevated CO2 Effects on Peatland CH4 Emissions. Journal of Geophysical Research: Biogeosciences 126, e2020JG005963. https://doi.org/10.1029/2020JG005963

Zegeye, A., Ona-Nguema, G., Carteret, C., Huguet, L., Abdelmoula, M., Jorand, F., 2005. Formation of Hydroxysulphate Green Rust 2 as a Single Iron(II-III) Mineral in Microbial Culture. Geomicrobiology Journal 22, 389–399. https://doi.org/10.1080/01490450500248960

Zhang, W., Wang, Y., Liu, L., Pan, Y., Lin, W., 2021. Identification and Genomic Characterization of Two Previously Unknown Magnetotactic Nitrospirae. Front. Microbiol. 0. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.690052

Zhang, W.-J., Chen, C., Li, Y., Song, T., Wu, L.-F., 2010. Configuration of redox gradient determines magnetotactic polarity of the marine bacteria MO-1. Environ. Microbiol. Rep. 2, 646–650. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00150.x

Zhao, Y., Zhang, Wenyan, Pan, H., Chen, J., Cui, K., Wu, L.-F., Lin, W., Xiao, T., Zhang, Wuchang, Liu, J., 2023. Insight into the metabolic potential and ecological function of a novel Magnetotactic Nitrospirota in coral reef habitat. Front Microbiol 14, 1182330. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1182330

Annexe 1

Chapitre I

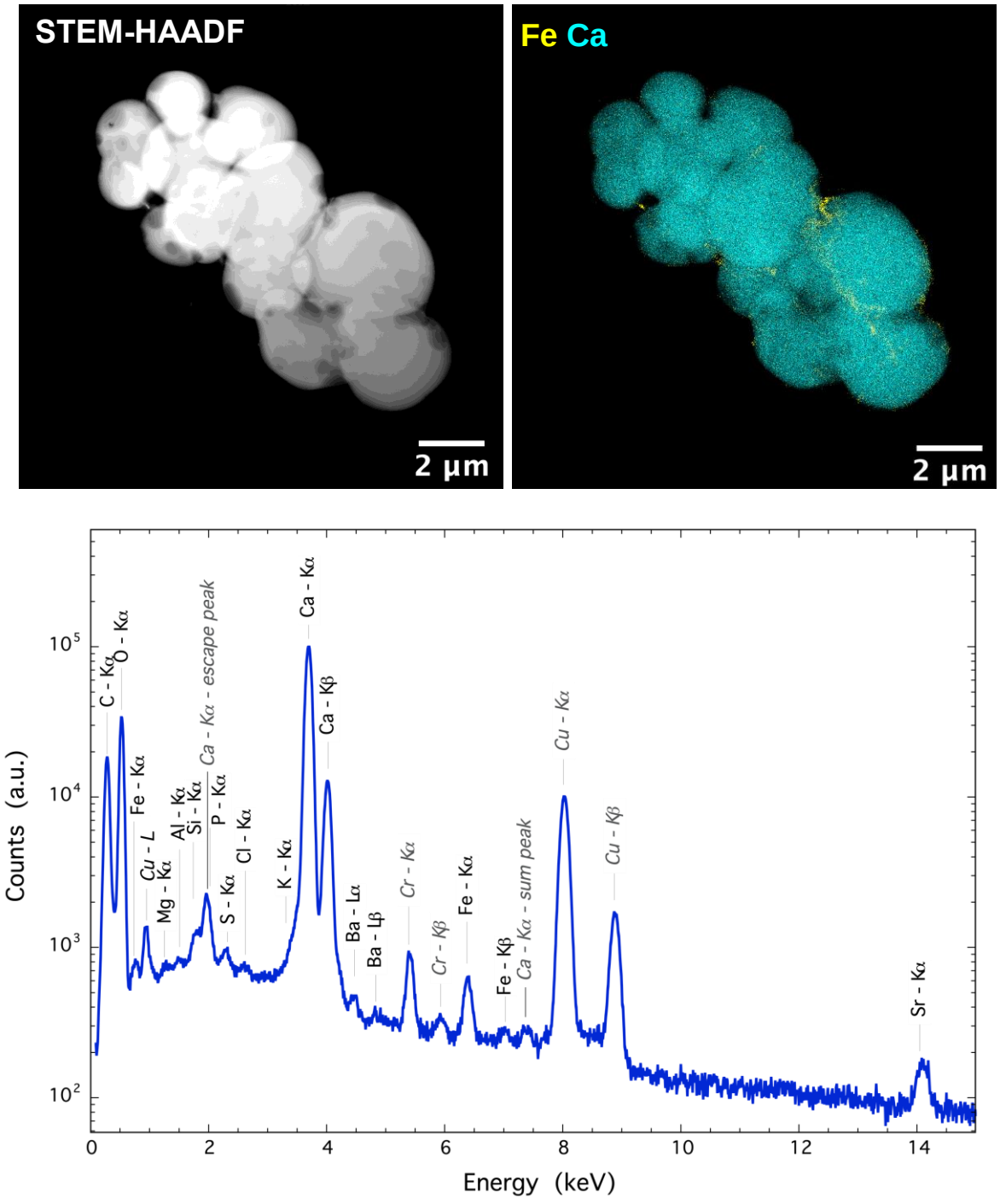
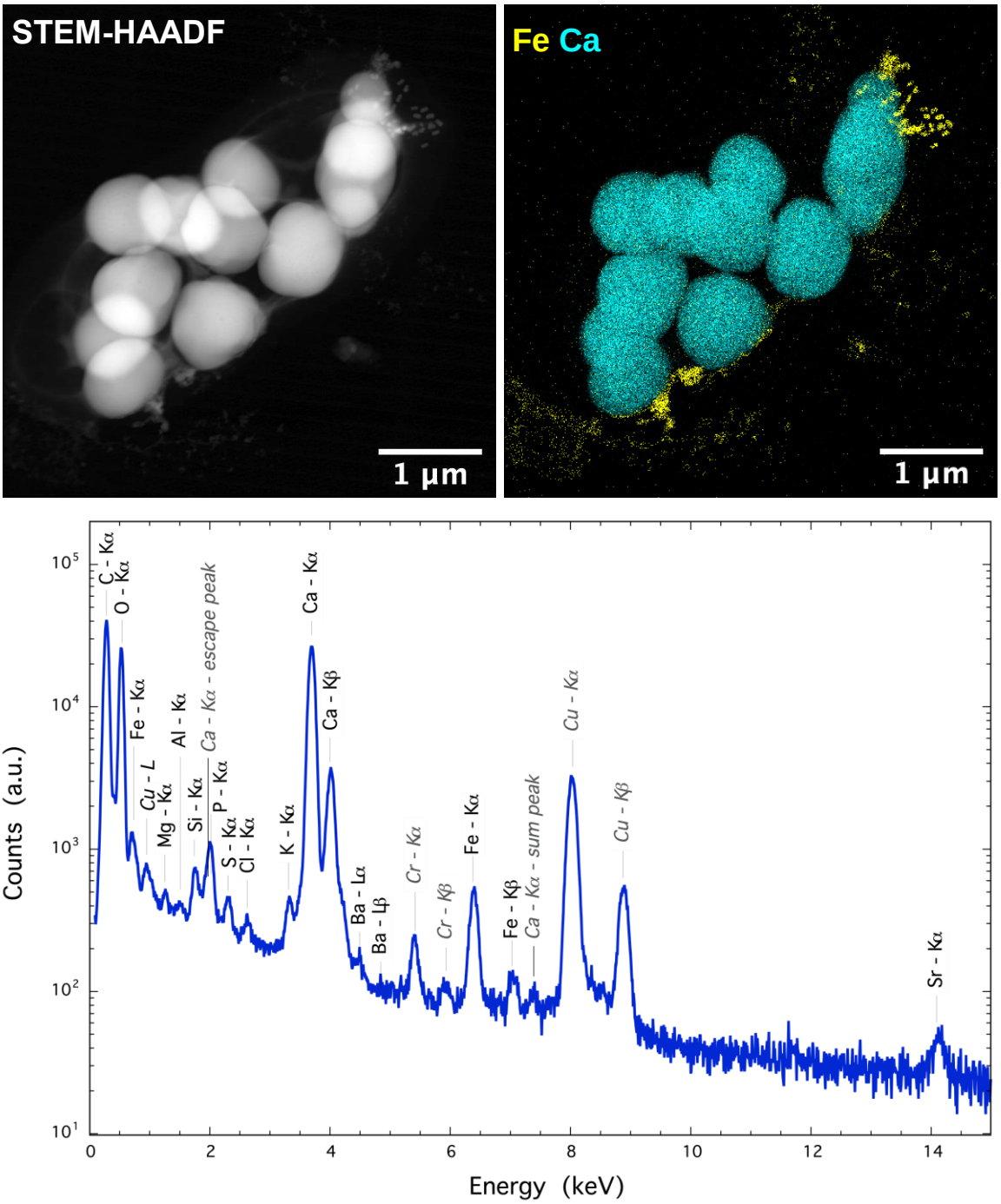


Figure S1 : **Cartographie élémentaire XEDS du Calcium (Ca-K), et Fer (Fe-K) pour une cellule appartenant au morphotype 3 de iACCMTB associée à son spectre XEDS.**



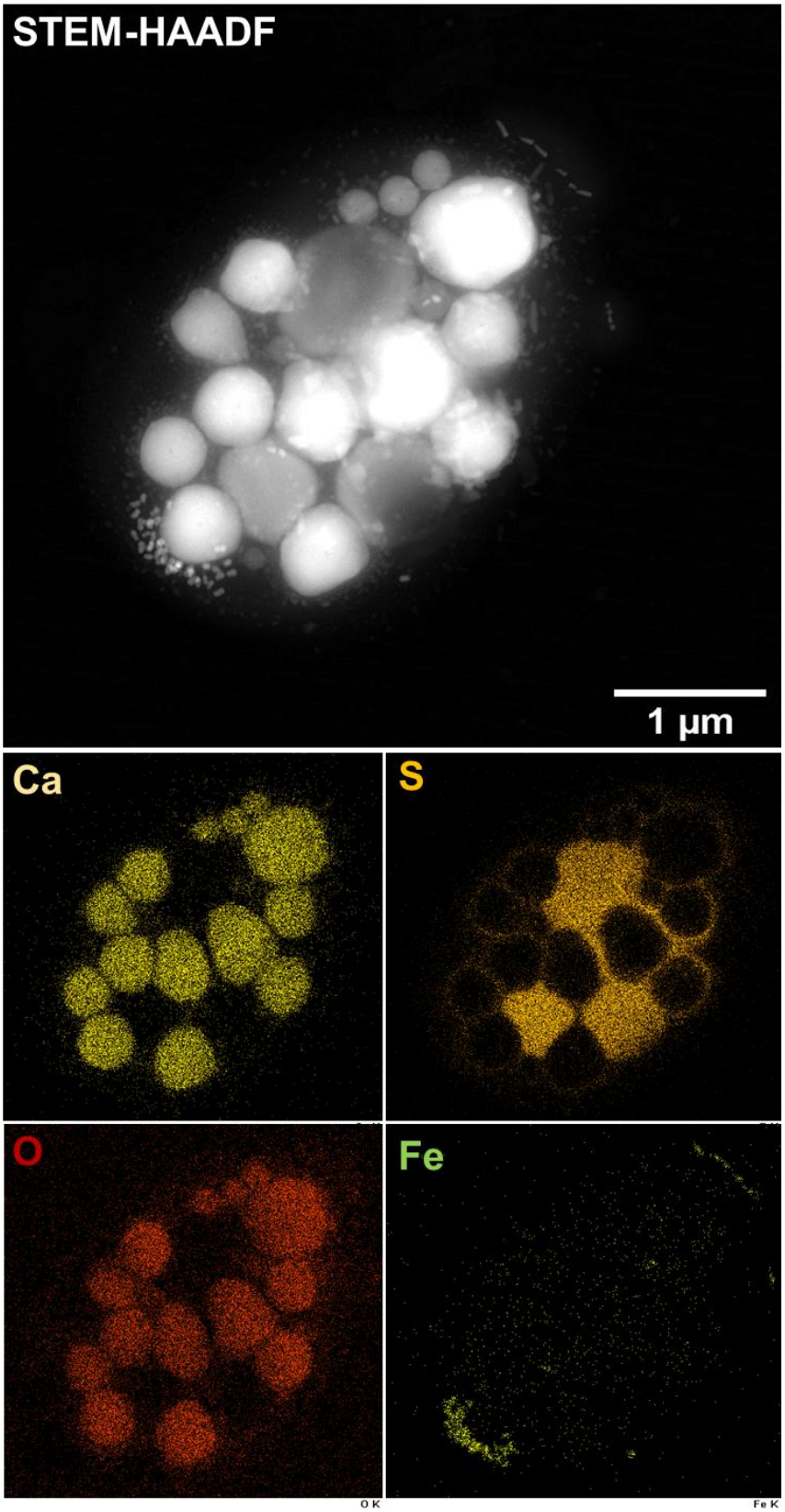
<u>Figure S2</u> : Cartographie élémentaire XEDS du Calcium (Ca-K), et Fer (Fe-K) pour une cellule appartenant au morphotype 4 de $_{iACC}$MTB associée à son spectre XEDS.

Tableau S3a : Analyse comparative des voies métaboliques KEGG à partir desquelles au moins une activité enzymatique est prédite dans l'un des génomes. Les numéros EC annotés et les prédictions de la famille KEGG Orthology (logiciel KOfamScan) sont utilisés pour cartographier les gènes avec leurs activités enzymatiques correspondantes. Cette comparaison est basée sur le calcul d'une valeur « d'achèvement de la voie », c'est-à-dire le nombre de réactions pour la voie x dans un organisme donné/le nombre total de réactions dans la même voie x définie dans la base de données KEGG.

Class	Reference pathway	Module	Reactions number	Pathway completion							
				Azospirillaceae bacterium CCP2-SC5	Uncultured Gammaproteobacteria bacterium WCLP8	Gammaproteobacteria bacterium CCP3-SC1	Gammaproteobacteria bacterium CCP3-SC15AN1	Gammaproteobacteria bacterium CCP3-SC1AL1	Gammaproteobacteria bacterium CCP3-SC5AM1	Gammaproteobacteria bacterium CCP4-SC76	Candidatus Achromatium palustre Sipp_2015
CARBOHYDRATE METABOLISM											
	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism										
		M00549: Nucleotide sugar biosynthesis, glucose => UDP-glucose	4	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	0	0,75
		M00761: Undecaprenylphosphate alpha-L-Ara4N biosynthesis, UDP-GlcA => undecaprenyl phosphate alpha-L-Ara4N	5	0	0	0	0,2	0	0	0	0
		M00892: UDP-N-acetyl-D-glucosamine biosynthesis, eukaryotes, glucose => UDP-GlcNAc	6	0,67	0,67	0,5	0,33	0,67	0,67	0	0,67
		M00909: UDP-N-acetyl-D-glucosamine biosynthesis, prokaryotes, glucose => UDP-GlcNAc	6	1	1	0,83	0,33	1	1	0,17	1
	Ascorbate and aldarate metabolism										
		M00114: Ascorbate biosynthesis, plants, fructose-6P => ascorbate	8	0,5	0,25	0,38	0,38	0,38	0,38	0,25	0,38
		M00129: Ascorbate biosynthesis, animals, glucose-1P => ascorbate	8	0,13	0,25	0,25	0,25	0,25	0,38	0,25	0,25
		M00550: Ascorbate degradation, ascorbate => D-xylulose-5P	5	0	0	0	0,2	0	0	0	0
	Butanoate metabolism										
		M00027: GABA (gamma-Aminobutyrate) shunt	5	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0	0,4
		M00088: Ketone body biosynthesis, acetyl-CoA => acetoacetate/3-hydroxybutyrate/acetone	5	0,2	0,4	0,2	0,4	0	0	0	0,2
	C5-Branched dibasic acid metabolism										
		M00535: Isoleucine biosynthesis, pyruvate => 2-oxobutanoate	4	1	1	1	1	1	1	0,25	1
	Citrate cycle (TCA cycle)										
		M00003: Gluconeogenesis, oxaloacetate => fructose-6P	11	0,82	0,36	0,55	0,27	0,45	0,55	0,18	0,45
		M00009: Citrate cycle (TCA cycle, Krebs cycle)	22	0,77	0,77	0,59	0,32	0,55	0,59	0,14	0,73
		M00010: Citrate cycle, first carbon oxidation, oxaloacetate => 2-oxoglutarate	8	0,88	0,88	0,88	0,13	0,75	0,88	0,38	0,88
		M00011: Citrate cycle, second carbon oxidation, 2-oxoglutarate => oxaloacetate	14	0,71	0,71	0,43	0,43	0,43	0,43	0	0,64
		M00307: Pyruvate oxidation, pyruvate => acetyl-CoA	6	1	0,5	1	0,83	1	1	0,5	1
		M00740: Methylaspartate cycle	14	0,79	0,71	0,5	0,21	0,43	0,5	0,21	0,5
	Fructose and mannose metabolism										
		M00114: Ascorbate biosynthesis, plants, fructose-6P => ascorbate	8	0,5	0,25	0,38	0,38	0,38	0,38	0,25	0,38
	Galactose metabolism										
		M00552: D-galactonate degradation, De Ley-Doudoroff pathway, D-galactonate => glycerate-3P	5	0,4	0,4	0,4	0	0,4	0,4	0	0,4
		M00632: Galactose degradation, Leloir pathway, galactose => alpha-D-glucose-1P	4	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	Glycolysis / Gluconeogenesis										
		M00001: Glycolysis (Embden-Meyerhof pathway), glucose => pyruvate	15	0,6	0,47	0,6	0,4	0,53	0,67	0,2	0,6
		M00002: Glycolysis, core module involving three-carbon compounds	8	0,75	0,5	0,75	0,25	0,63	0,75	0,25	0,75
		M00003: Gluconeogenesis, oxaloacetate => fructose-6P	11	0,82	0,36	0,55	0,27	0,45	0,55	0,18	0,45
		M00307: Pyruvate oxidation, pyruvate => acetyl-CoA	6	1	0,5	1	0,83	1	1	0,5	1
	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism										
		M00012: Glyoxylate cycle	8	0,88	0,88	0,5	0,25	0,38	0,5	0	0,5
		M00373: Ethylmalonyl pathway	14	0,93	1	0,14	0,07	0	0	0,07	0,14
		M00532: Photorespiration	10	0,4	0,4	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,6
		M00621: Glycine cleavage system	3	1	1	1	1	1	1	0	1
		M00740: Methylaspartate cycle	14	0,79	0,71	0,5	0,21	0,43	0,5	0,21	0,5
		M00741: Propanoyl-CoA metabolism, propanoyl-CoA => succinyl-CoA	3	1	1	0	0	0	0	0	0
		M00968: Pentose bisphosphate pathway (nucleoside degradation), archaea, nucleoside/NMP => 3-PGA/glycerone p	11	0,09	0,09	0,27	0,18	0,18	0,18	0,09	0,18
	Inositol phosphate metabolism										
		M00131: Inositol phosphate metabolism, Ins(1,3,4,5)P4 => Ins(1,3,4)P3 => myo-inositol	4	0,25	0,25	0,25	0	0,25	0,25	0	0,25
	Pentose and glucuronate interconversions										
		M00014: Glucuronate pathway (uronate pathway)	11	0	0,09	0,09	0,09	0,09	0,18	0,18	0,09
		M00129: Ascorbate biosynthesis, animals, glucose-1P => ascorbate	8	0,13	0,25	0,25	0,25	0,25	0,38	0,25	0,25
	Pentose phosphate pathway										
		M00004: Pentose phosphate pathway (Pentose phosphate cycle)	12	0,67	0,67	0,83	0,58	0,33	0,83	0,33	0,5
		M00005: PRPP biosynthesis, ribose 5P => PRPP	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		M00006: Pentose phosphate pathway, oxidative phase, glucose 6P => ribulose 5P	5	0,2	0,2	0,8	1	0	1	0,4	0
		M00007: Pentose phosphate pathway, non-oxidative phase, fructose 6P => ribose 5P	5	1	1	0,8	0	0,4	0,6	0,4	0,8
		M00008: Entner-Doudoroff pathway, glucose-6P => glyceraldehyde-3P + pyruvate	4	0,25	0,25	0,25	0,5	0	0,5	0	0
		M00308: Semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway, gluconate => glycerate-3P	7	0,29	0,29	0,29	0	0,29	0,29	0	0,29
		M00345: Formaldehyde assimilation, ribulose monophosphate pathway	7	0,29	0,29	0,57	0,57	0,29	0,57	0,29	0,29
		M00580: Pentose phosphate pathway, archaea, fructose 6P => ribose 5P	3	0,33	0,33	0,33	0	0,33	0,33	0	0,33
		M00968: Pentose bisphosphate pathway (nucleoside degradation), archaea, nucleoside/NMP => 3-PGA/glycerone p	11	0,09	0,09	0,27	0,18	0,18	0,18	0,09	0,18
	Propanoate metabolism										
		M00013: Malonate semialdehyde pathway, propanoyl-CoA => acetyl-CoA	7	0,29	0,29	0	0	0	0	0	0
		M00741: Propanoyl-CoA metabolism, propanoyl-CoA => succinyl-CoA	3	1	1	0	0	0	0	0	0
	Pyruvate metabolism										
		M00168: CAM (Crassulacean acid metabolism), dark	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0,5
		M00169: CAM (Crassulacean acid metabolism), light	2	1	1	1	1	1	1	0,5	1
		M00172: C4-dicarboxylic acid cycle, NADP - malic enzyme type	4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5
		M00307: Pyruvate oxidation, pyruvate => acetyl-CoA	6	1	0,5	1	0,83	1	1	0,5	1
		M00579: Phosphate acetyltransferase-acetate kinase pathway, acetyl-CoA => acetate	2	0	0	0	0	0	0	0,5	0
	Starch and sucrose metabolism										
		M00565: Trehalose biosynthesis, D-glucose 1P => trehalose	6	0,33	0,67	0,5	0,33	0,5	0,5	0,17	0,5
		M00854: Glycogen biosynthesis, glucose-1P => glycogen/starch	5	0,4	0,8	0,8	0,6	0,8	0,8	0,2	0,8
		M00855: Glycogen degradation, glycogen => glucose-6P	2	1	1	1	1	1	1	0,5	1
ENERGY METABOLISM											
	Carbon fixation in photosynthetic organisms										
		M00165: Reductive pentose phosphate cycle (Calvin cycle)	12	0,83	0,42	0,75	0,33	0,42	0,75	0	0,58
		M00166: Reductive pentose phosphate cycle, ribulose-5P => glyceraldehyde-3P	5	0,6	0,4	0,8	0,4	0,8	0,8	0	0,8
		M00167: Reductive pentose phosphate cycle, glyceraldehyde-3P => ribulose-5P	7	1	0,43	0,71	0,29	0,14	0,71	0	0,43
		M00168: CAM (Crassulacean acid metabolism), dark	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0,5
		M00169: CAM (Crassulacean acid metabolism), light	2	1	1	1	1	1	1	0,5	1
		M00170: C4-dicarboxylic acid cycle, phosphoenolpyruvate carboxykinase type	3	0,33	0,67	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
		M00171: C4-dicarboxylic acid cycle, NAD - malic enzyme type	6	0,67	0,5	0,67	0,67	0,67	0,67	0,33	0,67
		M00172: C4-dicarboxylic acid cycle, NADP - malic enzyme type	4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5
	Carbon fixation pathways in prokaryotes										
		M00173: Reductive citrate cycle (Arnon-Buchanan cycle)	18	0,56	0,61	0,78	0,5	0,72	0,83	0,28	0,61
		M00374: Dicarboxylate-hydroxybutyrate cycle	14	0,57	0,57	0,5	0,43	0,43	0,43	0,14	0,36
		M00375: Hydroxypropionate-hydroxybutylate cycle	16	0,5	0,56	0,13	0,13	0,06	0,06	0,13	0,13
		M00376: 3-Hydroxypropionate bi-cycle	18	0,61	0,78	0,17	0,17	0,17	0,17	0,11	0,11
		M00377: Reductive acetyl-CoA pathway (Wood-Ljungdahl pathway)	10	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1
		M00579: Phosphate acetyltransferase-acetate kinase pathway, acetyl-CoA => acetate	2	0	0	0	0	0	0	0,5	0
		M00620: Incomplete reductive citrate cycle, acetyl-CoA => oxoglutarate	7	0,71	0,71	0,86	0,71	0,71	0,86	0,14	0,71
	Methane metabolism										
		M00020: Serine biosynthesis, glycerate-3P => serine	3	1	1	0,67	0,33	0,67	1	0,33	0,67
		M00174: Methane oxidation, methanotroph, methane => formaldehyde	3	0,33	0	0	0	0	0	0	0
		M00344: Formaldehyde assimilation, xylulose monophosphate pathway	4	0,5	0	0,25	0,25	0	0,25	0	0
		M00345: Formaldehyde assimilation, ribulose monophosphate pathway	7	0,29	0,29	0,57	0,57	0,29	0,57	0,29	0,29
		M00346: Formaldehyde assimilation, serine pathway	9	0,67	0,56	0,33	0,33	0,33	0,33	0,22	0,33
		M00356: Methanogenesis, methanol => methane	7	0	0	0,57	0,14	0,29	0,57	0	0
		M00357: Methanogenesis, acetate => methane	11	0,09	0,09	0,36	0,18	0,27	0,45	0,09	0,09
		M00358: Coenzyme M biosynthesis	5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,2
		M00563: Methanogenesis, methylamine/dimethylamine/trimethylamine => methane	9	0	0	0,44	0,11	0,22	0,44	0	0
		M00567: Methanogenesis, CO2 => methane	13	0	0	0,31	0,08	0,15	0,31	0	0
		M00935: Methanofuran biosynthesis	6	0	0	0,17	0,17	0,17	0	0	0
	Nitrogen metabolism										
		M00529: Denitrification, nitrate => nitrogen	6	0,17	0,5	0,33	0,5	0,17	0,17	0,17	0,5
		M00530: Dissimilatory nitrate reduction, nitrate => ammonia	6	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
		M00531: Assimilatory nitrate reduction, nitrate => ammonia	7	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
		M00804: Complete nitrification, comammox, ammonia => nitrite => nitrate	3	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
	Oxidative phosphorylation										
		M00142: NADH:ubiquinone oxidoreductase, mitochondria	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		M00144: NADH:quinone oxidoreductase, prokaryotes	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		M00145: NAD(P)H:quinone oxidoreductase, chloroplasts and cyanobacteria	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		M00148: Succinate dehydrogenase (ubiquinone)	1	1	1	1	1	1	1	0	1
		M00149: Succinate dehydrogenase, prokaryotes	1	1	1	1	1	1	1	0	1
		M00150: Fumarate reductase, prokaryotes	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	Sulfur metabolism										
		M00021: Cysteine biosynthesis, serine => cysteine	2	1	1	1	0	1	1	0,5	0,5
		M00176: Assimilatory sulfate reduction, sulfate => H2S	5	1	1	0,6	0,2	0,2	0,6	0	0,4
		M00595: Thiosulfate oxidation by SOX complex, thiosulfate => sulfate	1	0	0	1	1	1	1	1	1
		M00596: Dissimilatory sulfate reduction, sulfate => H2S	3	0,33	0,33	1	1	0,67	1	0,67	1

Tableau S3b : Analyse comparative des voies métaboliques MicroCyc à partir desquelles au moins une activité enzymatique est prédite dans l'un des génomes des endosymbiontes. MicroCyc est une collection de bases de données sur les voies/génomes microbiens (PGDB) créées dans le contexte des projets MicroScope. Ils sont pris en charge par le logiciel Pathway Tools développé par Peter Karp et son équipe de SRI international. Ces PGDB ont été générées à l'aide du module PathoLogic qui calcule un ensemble initial de voies en comparant les annotations d'un génome à la base de données de référence métabolique MetaCyc. Cette comparaison est basée sur le calcul d'une valeur « d'achèvement de la voie », c'est-à-dire le nombre de réactions pour la voie x dans un organisme donné/le nombre total de réactions dans la même voie x définie dans la base de données MetaCyc.

Superclass	Class	Pathway	Reactions number	Pathway completion								
				Aciguibacteraceae bacterium CC20-SC5	Unclassified Gammaproteobacteria/unclassified MCP8	Gammaproteobacteria bacterium CC20-SC1	Gammaproteobacteria bacterium CC20-SC1-MA1	Gammaproteobacteria bacterium CC20-SC1-AL1	Gammaproteobacteria bacterium CC20-SC1-AM6	Gammaproteobacteria bacterium CC20-SC76	Candidatus Achromatium palustre Skp_30_15
DEGRADATION/UTILIZATION/ASSIMILATION											
		Alcohols Degradation									
		glycerol degradation I	2	0	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0,5	0
		glycerol degradation V	2	0	0	0	0	0	0	0,5	0
		Aldehyde Degradation									
		methylglyoxal degradation I	3	0,67	0,67	0,33	0,33	0	0,33	0,67	0,33
		methylglyoxal degradation III	2	0	0	0	0	0	0	0,5	0
		Amines and Polyamines Degradation									
		4-aminobutyrate degradation II	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0,5
		creatinine degradation I	4	0,25	0	0	0	0	0	0	0
		Amino Acids Degradation									
		2-ketoglutarate dehydrogenase complex	3	1	1	0,33	0,33	1	1	0	1
		alanine degradation III	1	1	0	1	1	1	1	0	1
		arginine degradation IV (arginine decarboxylase/agmatine deiminase pathway)	3	0	0	1	0,67	0	0	0	0
		asparagine degradation I	1	1	1	0	0	0	0	0	0
		aspartate degradation I	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		branched-chain α-keto acid dehydrogenase complex	3	0,33	0,33	0,33	0,33	0	0,33	0	0
		citrulline degradation	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
		glutamate degradation I	1	0	1	1	0	0	0	0	1
		glutamate degradation II	2	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
		glutamine degradation I	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		glycine cleavage complex	3	1	1	1	1	1	1	1	1
		histidine degradation II	5	0	0	0	0	0	0	0,2	0
		isoleucine degradation I	6	0,5	0,5	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
		L-cysteine degradation II	1	1	1	1	0	1	1	0	0
		L-serine degradation	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		lysine fermentation to acetate and butyrate	10	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1
		methionine degradation I (to homocysteine)	3	0,67	0,33	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67
		methionine degradation II		0	0	0	0	0	0	0	1
		ornithine degradation I (proline biosynthesis)	1	1	0	0	0	0	0	0	0
		phenylalanine degradation I (aerobic)	3	0	0,33	0,33	0,33	0	0,33	0	0
		proline degradation	2	1	0	0	0	0	0	0	0
		threonine degradation I	4	0	0	0,25	0	0	0	0,5	0
		threonine degradation II	2	0,5	0	0	0	0	0	0	0
		tryptophan degradation VI (via tryptamine)	3	0	0	0,33	0,33	0,33	0	0	0
		valine degradation I	6	0,25	0,25	0,13	0,25	0,13	0,13	0,13	0,25
		Aromatic Compounds Degradation									
		catechol degradation to 2-oxopent-4-enoate I	2	0	0	0	0	0	0	0	0,5
		cyanurate degradation	3	0,33	0	0	0	0	0	0	0
		gentisate degradation	3	0,33	0,33	0	0	0	0	0	0
		orthanilate degradation	3	0,25	0	0	0	0	0	0	0
		phenylacetate degradation I (aerobic)	9	0,22	0,22	0	0	0	0	0	0
		protocatechuate degradation II (ortho-cleavage pathway)	4	0,25	0,25	0,25	0,25	0	0	0	0,25
		shikimate degradation I	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		toluene degradation to 2-oxopent-4-enoate I (via o-cresol)	4	0	0	0	0	0	0	0	0,25
		C1 Compounds Utilization and Assimilation									
		Calvin-Benson-Bassham cycle	13	0,69	0,46	0,69	0,46	0,46	0,62	0,15	0,62
		formaldehyde assimilation I (serine pathway)	12	0,5	0,42	0,33	0,25	0,33	0,33	0,25	0,33
		formaldehyde oxidation V (tetrahydrofolate pathway)	3	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,33
		formate oxidation to CO2	1	1	1	1	1	1	1	0	0
		methane oxidation to methanol I	1	1	0	0	0	0	0	0	0
		reductive acetyl coenzyme A pathway	8	0,5	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,25	0,13
		reductive monocarboxylic acid cycle	2	0	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0,5	0
		reductive TCA cycle I	12	0,58	0,67	0,75	0,42	0,75	0,83	0,25	0,58
		Carbohydrates Degradation									
		(1,6)-β-xylan degradation	2	0	0	0	0,5	0	0	0	0
		cellulose degradation I (cellulosome)	8	0,13	0	0,13	0	0	0,13	0	0
		galactose degradation I (Leloir pathway)	5	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
		glucose and gluconate-1-phosphate degradation	5	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4	0	0,4
		glycogen degradation I	7	0,71	0,71	0,43	0,57	0,43	0,71	0,29	0,86
		glycogen degradation II	5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,4	0,8	0,4	0,8
		glycogen degradation III	6	0,5	0,5	0,67	0,5	0,33	0,67	0,33	0,67
		Carboxylates Degradation									
		acetate conversion to acetyl-CoA	1	1	1	0	1	1	1	0	1
		acetyl-CoA biosynthesis I (pyruvate dehydrogenase complex)	3	1	0,33	1	1	1	1	0,33	1
		citrate degradation	5	0	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0
		conversion of succinate to propionate	3	0,67	0,67	0	0	0	0	0	0
		glutaryl-CoA degradation	5	0,4	0,8	0	0,2	0	0,2	0	0
		glycolate and glyoxylate degradation II	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0
		methylmalonyl pathway	3	1	1	0	0	0	0	0	0
		mevalonate degradation	2	0	0,5	0	0	0	0	0	0
		Chlorinated Compounds Degradation									
		3-chlorocatechol degradation II (ortho)	5	0	0	0,2	0	0	0	0	0
		Degradation/Utilization/Assimilation - Other									
		acrylonitrile degradation	3	0	0,33	0	0	0	0	0	0
		alkylnitronates degradation	2	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0	0,5
		glycocholate metabolism (bacteria)	7	0	0	0	0	0	0	0,14	0
		Fatty Acid and Lipids Degradation									
		acetoacetate degradation (to acetyl CoA)	2	0,5	0,5	0	1	0	0	0	0
		fatty acid β-oxidation I	7	0,43	0,57	0	0,14	0,14	0,29	0,29	0
		glycerol degradation I	2	0	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0,5	0
		oleate β-oxidation	3	0,67	0,67	0	0	0	0	0	0
		Inorganic Nutrients Metabolism									
		(R)-cysteate degradation	3	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
		ammonia assimilation cycle I	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1
		ammonia oxidation I (aerobic)	2	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0
		ammonia oxidation III	2	0	0,5	0	0	0	0	0	0
		ammonium transport	1	1	1	0	0	0	0	1	1
		intra-aerobic nitrite reduction	2	0	0	0	0,5	0	0	0	0,5
		methylthiopropionate degradation I (cleavage)	3	0,33	0,33	0	0	0	0	0	0
		nitrate reduction VIII (dissimilatory)	4	1	1	1	1	1	1	1	1
		nitrogen fixation	1	0	0	0	0				1
		phosphate acquisition	1	0	0	0	1	0	1	0	0
		phosphate utilization in cell wall regeneration	1	0	0	0	1	0	1	0	0
		sulfate activation for sulfonation	2	1	1	0	0,5	0,5	1	0	1
		sulfate reduction I (assimilatory)	4	0,75	0,75	0,75	0,25	0,25	0,5	0	0,5
		sulfate reduction III (assimilatory)	3	0,33	0,67	0,33	0,33	0	0,33	0	0,33
		sulfate reduction V (dissimilatory)	4	0,25	0,25	0,75	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75
		sulfide oxidation I (sulfide-quinone reductase)	1	0	0	1	1	1	1	1	1
		sulfide oxidation II (sulfide dehydrogenase)	1	0	0	1	1	1	1	1	0
		sulfite oxidation I (sulfite oxidoreductase)	1	0	0	0	1	0	0	0	0
		sulfite oxidation III	2	0,5	0,5	1	1	0,5	1	0,5	1
		sulfolactate degradation III	3	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
		sulfur oxidation IV (intracellular sulfur)	4	0	0	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
		sulfur reduction II (via polysulfide)	1	0	0	1	1	0	0	0	1
		thiosulfate disproportionation III (rhodanese)	1	0	1	1	1	0	1	0	0
		Nucleosides and Nucleotides Degradation									
		adenosine nucleotides degradation II	5	0,2	0,4	0,2	0	0,2	0,2	0	0,2
		guanosine nucleotides degradation III	4	0,25	0,5	0,25	0	0,25	0,25	0	0,25
		pseudouridine degradation	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		purine deoxyribonucleosides degradation	7	0	0,43	0	0	0	0	0	0
		purine ribonucleosides degradation to ribose-1-phosphate	6	0	0,83	0	0	0	0	0	0
		S-methyl-5'-thioadenosine degradation II	1	1	1	0	0	0	0	0	1
		S-methyl-5'-thioadenosine degradation III	2	0	0	1	0,5	0	1	0,5	0
		S-methyl-5-thio-α-D-ribose 1-phosphate degradation	5	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0,2	0,2	0,2
		uracil degradation III	4	0	0,25	0	0	0	0	0	0
		urate biosynthesis/inosine 5'-phosphate degradation	4	0,5	0,75	0,5	0	0,5	0,5	0,25	0,5
		Protein Degradation									
		seed germination protein turnover	1	1	1	1	0	1	1	0	1
		wound-induced proteolysis I	1	1	1	1	0	1	1	0	1
		Secondary Metabolites Degradation									
		1,6-anhydro-N-acetylmuramic acid recycling	2	0	0,5	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0
		DIMBOA-glucoside degradation	1	0	0	1	1	1	0	1	0
		L-idonate degradation	3	0	0	0	0	0	0	0,33	0
		N-acetylglucosamine degradation I	2	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0
		Steroids Degradation									
		androstenedione degradation	14	0,07	0,07	0	0	0,07	0	0	0
		cholesterol degradation to androstenedione I (cholesterol oxidase)	17	0,06	0,06	0	0	0,06	0	0	0
		cholesterol degradation to androstenedione II (cholesterol dehydrogenase)	17	0,06	0,06	0	0	0,06	0	0	0
DETOXIFICATION											
		Acid Resistance									
		arginine dependent acid resistance	1	0	0	1	1	0	0	0	0
		Antibiotic Resistance									
		polymyxin resistance	6	0,17	0,17	0,17	0,33	0,17	0	0	0
		Arsenate Detoxification									
		arsenate detoxification II (glutaredoxin)	1	1	1	0	0	0	0	0	1
		Methylglyoxal Detoxification									
		methylglyoxal degradation I	3	0,67	0,67	0,33	0,33	0	0,33	0,67	0,33
		Other									
		oxidized GTP and dGTP detoxification	2	0,5	0,5	0	0,5	0	0,5	0,5	0
		superoxide radicals degradation	2	0,5	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0	0,5
GENERATION OF PRECURSOR METABOLITES AND ENERGY											
		Acetyl-CoA Biosynthesis									
		acetyl-CoA biosynthesis I (pyruvate dehydrogenase complex)	3	1	0,33	1	1	1	1	0,33	1
		acetyl-CoA biosynthesis III (from citrate)	1	0	0	0	0	0	1	0	1
		Chemoautotrophic Energy Metabolism									
		ammonia oxidation I (aerobic)	2	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0
		formate oxidation to CO2	1	1	1	1	1	1	1	0	0
		hydrogen oxidation I (aerobic)	1	0	0	1	0	0	1	1	0
		hydrogen oxidation II (aerobic, NAD)	1	1	0	1	0	0	0	0	0
		hydrogen oxidation III (anaerobic, NADP)	1	1	1	1	1	0	1	1	0
		sulfide oxidation I (sulfide-quinone reductase)	1	0	0	1	1	1	1	1	1
		sulfite oxidation I (sulfite oxidoreductase)	1	0	0	0	1	0	0	0	0
		Electron Transfer									
		NADH to cytochrome bd oxidase electron transfer	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5
		NADH to fumarate electron transfer	2	0,5	0,5	1	0,5	1	0,5	0,5	1
		nitrate reduction VIII (dissimilatory)	2	1	1	1	1	1	1	1	1
		succinate to cytochrome bd oxidase electron transfer	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
		Fermentation									
		lysine fermentation to acetate and butyrate	10	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1
		mixed acid fermentation	16	0,44	0,5	0,5	0,19	0,38	0,44	0,13	0,5
		pyruvate fermentation to acetone	5	0,2	0,4	0,2	0,6	0,2	0,2	0,2	0
		pyruvate fermentation to butanoate	7	0,43	0,57	0,14	0,14	0,14	0,43	0,29	0
		pyruvate fermentation to ethanol III	3	0	0,33	0,33	0	0,33	0,33	0,33	0,33
		pyruvate fermentation to lactate	1	1	0	0	0	0	0	0	0
		pyruvate fermentation to propionate I	7	0,71	0,71	0,43	0,29	0,43	0,29	0	0,29
		Glycolysis									
		glycolysis I	11	0,82	0,73	0,73	0,45	0,55	0,73	0,36	0,73
		glycolysis III (glucokinase)	10	0,9	0,9	0,7	0,5	0,6	0,8	0,3	0,9
		Hydrogen Production									
		hydrogen production I	1	0	0	1	0	0	0	0	0
		hydrogen production II	1	1	0	1	0	0	0	0	0
		hydrogen production III	1	0	0	1	0	0	0	0	0
		hydrogen production V	2	0,5	0	1	0,5	0,5	0,5	0	0
		nitrogen fixation	1	0	0	0	0	0	0	0	1
		Other									
		ethylmalonyl pathway	10	0,5	0,5	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1
		sedoheptulose bisphosphate bypass	2	0	0	0	0	0	0	0	0,5
		Pentose Phosphate Pathways									
		pentose phosphate pathway (non-oxidative branch)	5	1	0,8	0,8	0,4	0,4	0,6	0,4	0,8
		pentose phosphate pathway (oxidative branch)	3	0,33	0,33	0,67	1	0	1	0,33	0
		pentose phosphate pathway (partial)	3	1	1	1	0,67	0,33	0,67	0,33	1
		Photosynthesis									
		Calvin-Benson-Bassham cycle	13	0,69	0,46	0,69	0,46	0,46	0,62	0,15	0,62
		photosynthesis light reactions	4	0,25	0,25	0,25	0	0	0	0	0
		Respiration									
		2-ketoglutarate dehydrogenase complex	3	1	1	0,33	0,33	1	1	0	1
		aerobic respiration (cytochrome c)	4	1	0,75	1	1	1	1	0,5	0,75
		branched-chain α-keto acid dehydrogenase complex	3	0,33	0,33	0,33	0,33	0	0,33	0	0
		NADH to cytochrome bd oxidase electron transfer	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,5
		NADH to fumarate electron transfer	2	0,5	0,5	1	0,5	1	0,5	0,5	1
		nitrate reduction I (denitrification)	4	0	0,75	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5
		nitrate reduction IV (dissimilatory)	2	0	0	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1
		nitrate reduction VIII (dissimilatory)	2	1	1	1	1	1	1	1	1
		respiration (anaerobic)	13	0,62	0,62	0,77	0,38	0,62	0,69	0,15	0,69
		succinate to cytochrome bd oxidase electron transfer	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
		sulfate reduction V (dissimilatory)	4	0,25	0,25	0,75	0,75	0,5	0,75	0,5	0,75
		TCA cycle									
		TCA cycle I (prokaryotic)	10	0,9	0,9	0,8	0,5	0,8	0,9	0,1	0,9
		TCA cycle III (helicobacter)	9	0,67	0,67	0,78	0,33	0,67	0,67	0,11	0,78
		TCA cycle IV (2-oxoglutarate decarboxylase)	11	0,73	0,73	0,64	0,36	0,55	0,64	0,09	0,55
		TCA cycle V (2-oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase)	12	0,67	0,67	0,58	0,33	0,5	0,58	0,08	0,5
		TCA cycle VI (obligate autotrophs)	11	0,91	0,82	0,91	0,64	0,82	0,91	0,27	0,82



<u>Figure S4</u> : Cartographie élémentaire XEDS du Calcium (Ca-K), du Soufre (S-K), de l'oxygène (O-K) et du Fer (Fe-K) pour une cellule appartenant au morphotype 4 de iACCMTB.

Annexe 2

Chapitre IV - Tableaux des milieux de culture

- **Milieu de culture *Niveispirillum lacus* 1-14 (NR_159344.1)**

Produit (nom en anglais)	Quantité pour 1 L
Bacto yeast extract	0.5 g
Proteose peptone (Tryptone peptone)	0.5 g
Bacto casamino acids	0.5 g
Bacto dextrose	0.5 g
Soluble starch	0.5 g
Sodium pyruvate	0.3 g
KH_2PO_4	0.3 g
Magnesium sulfate	0.05 g
Bacto Agar	15 g (milieu solide)

Ajuster le milieu à pH 7,0 et autoclaver.

- **Milieu de culture *Niveispirillum irakense* DSM-11586 (NR_044949.1)**

Produit (nom en anglais)	Quantité pour 1 L
Peptone	5 g
Meat extract	3 g
Agar	15 g (milieu solide)

Ajuster le milieu à pH 7,0 et autoclaver.

- **Milieu de culture *Niveispirillum fermenti* CC-LY736 (NR_126263.1)**

Milieu TSA.

Produit (nom en anglais)	Quantité pour 1 L
Tryptone	15 g
Soya Peptone	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g (milieu solide)

Ajuster le milieu à pH 7,3 et autoclaver.

- **Milieu de culture *Indioceanicola profundi* SCSIO-08040 (NR_179811.1)**

N'ayant pas de milieu Marine Broth (MB) disponible dans l'institut, nous l'avons réalisé nous-même.

Produit (nom en anglais)	Quantité pour 1 L
Bacto peptone	5 g
Bacto yeast extract	1 g
Fe (III) citrate	0.10 g
NaCl	19.45 g
$MgCl_2$ (anhydrous)	5.90 g
Na_2SO_4	3.24 g
$CaCl_2$	1.80 g
KCl	0.55 g
$NaHCO_3$	0.16 g
KBr	0.08 g
$SrCl_2$	0.034 g
H_3BO_3	0.022 g
Na Silicate	0.004 g
NaF	0.0024 g
$(NH_4)NO_3$	0.0016 g
Na_2HPO_4	0.008 g
Peptone casein	1 g
Peptone soybean	1 g
Malt extract	1 g
Agar (milieu solide)	15 g

Ajuster le milieu à pH 7,6 et autoclaver

- **Milieu de culture *Skermanella pratensis* W17 (NR_179970.1)**

Milieu TSA.

Produit (nom en anglais)	Quantité pour 1 L
Tryptone	15 g
Soya Peptone	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g (milieu solide)

Ajuster le milieu à pH 7,3 et autoclaver

- **Milieu de culture *Skermanella rosea* M1 (NR_152076.1)**

Milieu R2A.

Produit (nom en anglais)	Quantité pour 1 L
Bacto yeast extract	0.5 g
Proteose peptone (Tryptone peptone)	0.5 g
Bacto casamino acids	0.5 g
Bacto dextrose	0.5 g
Soluble starch	0.5 g
Sodium pyruvate	0.3 g
KH_2PO_4	0.3 g
Magnesium sulfate	0.05 g
Bacto agar	15 g

Ajuster le milieu à pH 7,3 et autoclaver.

- **Milieu de culture *Macromonas bipunctata* D405 DSM 12705 (AB077037) :**

Milieu MACROMONAS DSMZ **847**

Produit (nom en anglais)	Formule	Concentration	Concentration molaire finale	Quantité pour 330 mL
Sodium thiosulfate pentahydrate	$Na_2S_2O_3$ x 5 H_2O	0.5 M (6.2 g dans 50 mL eau MQ) filtrée	4 mM	2.64 mL
Disodium succinate heptahydrate	$C_4H_4Na_2O_4$ x 6 H_2O	0.5 M (6.7 g dans 50 mL eau MQ) filtrée	2 mM	1.32 mL
Wolfe vitamin solution (remplace seven vitamin solution)				3.3 mL
Wolfe mineral solution (remplace trace element solution SL-11)				0.33 mL

Produit (nom en anglais)	Formule	Concentration molaire	Quantité pour 1 L
Ammonium sulfate	$(NH_4)_2SO_4$	2.2 mM	0.30 g
Magnesium sulfate heptahydrate	$MgSO_4$ x 7 H_2O	1.2 mM	0.30 g
Calcium chloride dihydrate	CaCl2 x 2 H2O	1 mM	0.15 g
Yeast extract			0.20 g
Agar (semi solide de DSMZ)			1 g
Agar solide			15 g
Liquide = sans agar			

Ajuster le milieu à pH 7,2-7,4 et autoclaver.

- **Milieu solide semi-solide à gradient d'oxygène semi souches pour les 6 souches proches phylogénétiquement des iACCMTB : *N. lacus, N. irakense, N. fermenti, S. rosea, S. pratensis* et *M. bipunctata***

Produit (nom en anglais)	**Formule chimique**	**Concentration molaire**	**Quantité for 500 mL**
Water	H_20		**500 mL**
Ammonium chloride	NH_4Cl_2	5.6 mM	**0.15 g**
Sodium chloride	NaCl	3.4 mM	**0.1 g**
Magnesium chloride	$MgCl_2$	2.1 mM	**0.1 g**
Potassium chloride	KCl	2.6 mM	**0.1 g**
Calcium chloride	$CaCl_2$	1.8 mM	**0.1 g**
Wolf's Minerals solution			**2.5 mL**
Resazurine			**50 µL**

Ajuster le pH à 7,0 et autoclaver

Ordre d'ajout	Produit (nom en anglais)	Formule chimique	*Fresh solution concentration*	Concentration molaire	Quantité pour 250 mL
1	*Sodium bicarbonate*	$NaHCO_3$	*1.26 g of sodium bicarbonate in 20 mL of miliQ water (0.7 M)*	14 mM	5 mL
1	*L-cysteine*	$C_3H_7NO_2S$	*0.4 g of cysteine in 10 mL of MiliQ water (0.3 M)*	3 mM	**2.5 mL**
2	*Iron(II) chloride*	$FeCl_2$	*0.4 g of fe in 20 mL of MiliQ water (0.1 M)*	36 µM	**90 µL**
Ajout soit de Glucose (20 mM), soit de Méthanol (25 mM) ou soit de Formate (20mM)					
3	*Vitamins*				**0.135 mL**
5	*Phosphate (PO_4) buffer*				**0.450 mL**

Annexe 3

Engagements scientifiques au cours de la période de thèse

1. Engagement dans une société savante : Membre de la Société française de microbiologie (SFM) dans le groupe de travail « Réseau des Jeunes Microbiologistes Fondamentalistes »
   https://www.sfm-microbiologie.org/presentation-de-la-sfm/sections-et-groupes-de-travail/groupe-rejmif/

2. Engagement dans un congrès scientifique : participation à l'organisation des évènements de la section Jeunes Microbiologistes (forum Carrières, stand, communication), organisation du Prix Poster et modération d'une session lors 17ème Congrès National de la SFM « Microbes 2022 » à Montpellier (France)

3. Organisatrice et modératrice du 5ème Webinar Jeunes Microbiologistes (JM) de la SFM « Interactions microbiennes » le 30/11/2022.
   https://app.livestorm.co/sfm-microbiologie/webinar-jm-interactiones-microbiennes?type=detailed

Société Française de Microbiologie
Association reconnue d'Utilité Publique, Décret du 17 mai 1993 (J.O. n°119)

Conseil d'Administration
2022-2025

Présidente
S. Burrel

Vice-Présidents
G. Lina
M.-F. Lartigue

Secrétaire Général
C. Burucoa

Secrétaire Général Adjoint
J. Le Goff

Trésorier
M. Federighi

Trésorière Adjointe
M. Lescat

Administrateurs
S. Alain
M. Amara
T. Bouchez
M. Bouix
S. Breurec
F. Caron
J.-W. Decousser
O. Dussurget
Ph. Glaser
S. Jarraud
M. Kempf
B. Lamy
F. Laurent
S. Pereyre
M. Pichon
M. Pierre-Demar
M. Solis

Attestation d'engagement réalisé au sein d'une association

La Société Française de Microbiologie certifie que Camille MANGIN est membre de la section Jeunes Microbiologistes et du groupe de travail « Réseau des Jeunes Microbiologistes Fondamentalistes ».

Son fort investissement dans l'association fut notamment apprécié lors de l'organisation du congrès Microbes 2022 qui a eu lieu du 3 au 5 octobre 2022 à Montpellier. En plus de participer activement à la tenue des évènements de la section Jeunes Microbiologistes (forum Carrières, stand, communication) lors de ce congrès, elle s'est particulièrement illustrée dans l'organisation du prix poster Jeunes Microbiologistes en mettant au point le barème d'évaluation. Elle a également modéré une session pendant cet évènement national.

Camille est également intervenue dans la mise en place d'un webinaire Jeunes Microbiologistes sur le thème des interactions microbiennes et a fait preuve d'un réel engagement pour la promotion du travail des jeunes microbiologistes français.

Pour ces raisons nous pouvons certifier qu'en plus de ses compétences scientifiques, Camille est une jeune microbiologiste soucieuse de tisser des liens dans la communauté scientifique et de porter la voix des jeunes chercheurs. Ses qualités humaines reconnues par ses jeunes collègues seront sans nul doute un atout précieux pour sa poursuite de carrière.

Fait à Paris, le 13 mars 2023.

Sonia Burrel
Présidente

36, avenue Jean Moulin - 75014 Paris - Tél.: 09 63 04 70 73
comptabilite@sfm-microbiologie.org / secretariat@sfm-microbiologie.org
www.sfm-microbiologie.org
SIRET 311934970 000 22 - IBAN FR76 4255 9100 0008 0146 7137 534 BIC : CCOPFRPPXXX

Résumé

De nombreuses espèces minérales sont produites par les êtres vivants. Cependant, la diversité des minéraux et celle des microorganismes qui les biominéralisent sont encore mal connues, tout comme les mécanismes moléculaires et géochimiques qui en sont à l'origine. Récemment, l'étude des sédiments et de la colonne d'eau du lac Pavin (Massif central, France) a révélé un groupe de bactéries capables de biominéraliser des cristaux ferrimagnétiques et des carbonates de calcium amorphes intracellulaires (iACC) dans des conditions environnementales défavorables à leur formation. Alors qu'elle a longtemps été limitée à des groupes de *Cyanobacteria* et de *Gammaproteobacteria,* la carbonatogenèse intracellulaire est alors apparue bien plus répandue que ce que l'on croyait. Une caractérisation plus approfondie des populations magnétotactiques formant des iACC ($_{iACC}$MTB) a donc été réalisée pour en déterminer la diversité spécifique et fonctionnelle, mais également pour comprendre les conditions environnementales de formation des iACC. Des études utilisant une combinaison d'approches de microbiologie environnementale, de génomique, de microscopie et de minéralogie sur des cellules triées par micromanipulation ont révélé de nouveaux groupes de $_{iACC}$MTB au sein des *Pseudomonadota* et *Thermodesulfobacteriota* formant des biominéraux de composition, structure et organisation variées. L'association des carbonates à différents métaux alcalino-terreux montre leur incorporation sélective en fonction des taxa et/ ou niches. De plus, la reconstruction des réseaux métaboliques suggère différentes voies de fixation du CO_2 à l'origine du carbone dans les carbonates et n'exclue pas un lien avec la dégradation des composés en C1 pour les *Alphaproteobacteria*. Ces travaux soutiennent que la carbonatogénèse intracellulaire a évolué de manière convergente et soulève des questions sur ses connections avec le cycle du C, notamment dans les lacs chimiquement stratifiés.

Mots clés *:* Microbiologie environnementale – biominéralisation – bactéries magnétotactiques – carbonatogenèse.

Abstract

Many mineral species are produced by organisms of all domains of life. However, the diversity of minerals and that of the biomineralizing microorganisms are still poorly understood, together with the molecular and geochemical mechanisms associated with. A recent study of the sediments and water column of Lake Pavin (Massif Central, France) has revealed a group of bacteria capable of biomineralizing intracellular ferrimagnetic crystals and intracellular amorphous calcium carbonates (iACC) under unfavorable environmental conditions to their formation. While it had long been restricted to groups of *Cyanobacteria* and *Gammaproteobacteria*, intracellular carbonatogenesis now appeared much more widespread than previously thought. A more in-depth characterization of magnetotactic iACC-forming populations ($_{iACC}$MTB) was therefore carried out to determine their specific and functional diversity, but also to understand the environmental conditions of iACC formation. Several studies using a combination of environmental microbiology, genomics, microscopy and mineralogy approaches on single-cells sorted by micromanipulation have revealed new MTB groups within *Pseudomonadota* and *Thermodesulfobacteriota* forming carbonate phases of varied composition, structure and organization. The association of carbonates with different alkaline earth metals shows their selective incorporation according to taxa and/or niches. Furthermore, the reconstruction of metabolic networks suggests different CO_2 fixation pathways at the origin of carbon in carbonates, and does not exclude a link with the degradation of C1 compounds for *Alphaproteobacteria*. This work supports the convergent evolution of intracellular carbonatogenesis and raises questions about its connections with the C cycle, particularly in chemically stratified lakes.

Key words*:* Environmental microbiology – biomineralization – magnetotactic bacteria – carbonatogenesis.