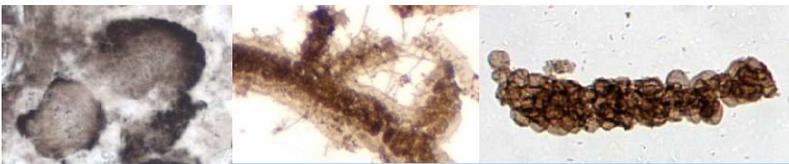


University of Liège

Faculty of Sciences

UR Astrobiology

*Early Life Traces & Evolution-Astrobiology*



# ***Biosignatures of fossil and modern cyanobacteria***



**Catherine DEMOULIN**

A dissertation presented in fulfillment of the requirements  
for the degree of Doctor in Sciences

**June 2024**



University of Liège

Faculty of Sciences

UR Astrobiology

*Early Life Traces & Evolution-Astrobiology*

---

## **Biosignatures of fossil and modern cyanobacteria**

---

A dissertation presented in fulfillment of the requirements for the degree of

Doctor in Sciences by

**Catherine Demoulin**

26<sup>th</sup> June 2024

### **Jury**

Pr. Frédéric Boulvain (University of Liège) – **President**

Dr Yannick Lara (University of Liège) – **Secretary**

Pr. Emmanuelle J. Javaux (University of Liège) – **Supervisor**

Dr Annick Wilmotte (University of Liège) – **Member**

Pr. Linda Kah (University of Tennessee) – **Member**

Dr Karim Benzerara (Sorbonne University) – **Member**







*“Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious. And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It matters that you don’t just give up.”*

Stephen Hawking

*To my parents, Lambi and my cats.*



## Acknowledgements

J'aimerais tout d'abord remercier ma promotrice Emmanuelle Javaux de m'avoir fait confiance en m'engageant comme doctorante. Merci d'avoir écouté mes idées et de m'avoir toujours encouragée à continuer cette thèse malgré certaines difficultés. Merci de m'avoir permis de faire plusieurs congrès ce qui m'a poussée à prendre confiance en moi et en mon travail et à parler devant beaucoup de monde, haha !

Je tiens à remercier les personnes avec qui j'ai pu travailler tout au long de cette thèse et grâce à qui, certains chapitres ont pu aboutir à de très bonnes publications. Parmi ces personnes, je remercie chaleureusement Carmen López Iglesias et Hans Duimel du laboratoire Microscopy CORE Lab de l'université de Maastricht pour leur enthousiasme dans mes recherches, leur excellent travail et leur aide précieuse pour la microscopie électronique. Je remercie également les personnes responsables des lignes synchrotrons sur lesquelles j'ai eu l'occasion de travailler et d'obtenir de belles données : Daniel Grolimund et Dario Ferrera Sanchez du synchrotron SLS, Villigen, Suisse ; Andrea Somogyi et Kadda Medjoubi du synchrotron Soleil, Gif-sur-Yvette, France ; et enfin, Remi Tucoulou Tachoueres du synchrotron ESRF, Grenoble, France. Merci également à Alexandre Fadel et Ahmed Addad pour leur accueil et travail au MEB et TEM à l'université de Lille. Enfin, merci à Philippe Compère et Sarah Smeets également pour leur travail au TEM et MEB à l'ULiège.

J'aimerais remercier mes collègues du labo *Early Life Traces and Evolution-Astrobiology*. Tout d'abord, Yannick avec qui j'ai bien rigolé (un peu trop parfois pour certains...) et qui m'a appris énormément sur les cyanobactéries et certaines techniques de labo. Merci de m'avoir aussi toujours poussée à continuer et finir ma thèse et d'avoir accepté (ou fait semblant d'accepter...) mon obsession pour les licornes. Merci à mon ancien voisin de bureau, Yohan, pour notre soutien mutuel dans nos thèses respectives et avec qui aussi j'ai bien rigolé. Merci aussi à Brooke, Maxime et Blaise pour la bonne ambiance du labo. Merci aux mémorants qui sont passés par le labo : Arnaud, Agathe, Giuseppe, Vincent et Samuel. Merci à Marie Catherine Sforza pour son aide sur certaines techniques et analyses de données. Enfin, merci à nos techniciens Alexandre Lambion, Marcela Giraldo et Joël Laval pour leur travail mais aussi leur gentillesse et surtout merci pour toutes vos blagues (surtout Alex et Joël), vous avez vraiment embelli cette expérience de vie de par votre présence. Merci à tous d'avoir supporté mon humour parfois fort enfantin et surtout le fait que je parle (apparemment...) un peu fort. Merci à nos secrétaires Mariella Guadagnano, Angela Della Vecchia et Joëlle Schmetz pour leur travail et leur aide précieuse.

Un tout grand merci à mes parents sans qui rien n'aurait été possible. Tout d'abord, merci d'avoir fait en sorte que je puisse suivre des études à l'université, ce qui m'a conduite à réaliser cette thèse. Merci d'avoir supporté mes crises de nerfs quand je n'en pouvais plus de la thèse. Merci d'avoir écouté toutes mes histoires de fossiles morts il y a au moins un milliard d'années même si maman, tu étais un peu perdue là-dedans mais toujours contente de m'écouter. Merci à toi papa pour m'avoir donné

le goût des sciences et de la recherche. Merci aussi pour nos discussions scientifiques me permettant de réfléchir à comment aborder certains points de ma thèse. Merci de m'avoir encouragée jusqu'à la fin. Merci à tous les deux d'être là. Merci également à ma sœur Marie, mon frère Jérôme et ma belle-sœur Lucie ainsi qu'à ma belle-famille pour votre soutien.

J'aimerais aussi remercier tous mes amis proches, Kim, Delphine, Geoffrey, Quentin, Nathan, Alice alias Claudy, Katty, Tanguy, Emeline, François et Vinciane, pour votre soutien et votre amitié.

Enfin, et surtout, je tiens à remercier mon Julien, alias mon Lambi, pour ton soutien et tes « coups de pied au cul » quand c'était nécessaire pour continuer et terminer ma thèse. Merci d'être toujours à mes côtés depuis toutes ces années, d'avoir toujours cru en moi et d'avoir supporté mes crises de nerfs et d'angoisses, mais aussi d'avoir partagé avec moi mes crises de joie. Merci à mes chats Bimo et Bounty, mes petits bébés, pour leur présence à mes côtés et aussi quand je travaillais (il y aura une preuve photo à la défense !), merci de m'avoir apporté du réconfort quand j'en avais vraiment besoin. Merci aussi à Domi, moineau domestique juvénile que j'ai sauvé cette année, pour m'avoir rappelé mes rêves d'enfant, à savoir dédier ma vie à aider et protéger les animaux, ce que je compte bien faire à présent. Je sais, les animaux ne liront pas ces remerciements mais j'étais obligée de les remercier tant ils ont été importants !

Merci à tous !

## Abstract

Cyanobacteria are well-known for being involved in events that profoundly modified the early biosphere and Earth. Cyanobacteria are the only prokaryotes doing the oxygenic photosynthesis. Thanks to this ability, they played a role in the oxygenation of the atmosphere and oceans during the Great Oxidation Event that took place around 2.4 Ga, which generated the development of new oxygenated ecological niches. Moreover, they are the ancestors of the chloroplast, the organelle where oxygenic photosynthesis takes place in eukaryotes. The chloroplast was formed during primary endosymbiosis from an engulfed and undigested cyanobacterium by a primitive unicellular eukaryote. Through the development of oxygenic niches and the formation of the chloroplast, cyanobacteria had a key role in the diversification of eukaryotes. Consequently, their study is of great importance to understand the evolution of the early Life and Earth. Despite this importance and the abundance of microfossils interpreted as cyanobacteria, their unambiguous fossil record remains scarce. Only three microfossils were identified for certainty as cyanobacteria using a set of criteria unique to this group of microorganisms.

This thesis focuses on the detailed study of microfossils interpreted as probable cyanobacterial microfossils, which may in fact represent also other prokaryotes or eukaryotes. The objective is to evaluate, using new criteria, and confirm or infirm with certainty their identification and improve our understanding of their early diversification. The morphology, morphometry, ultrastructure, chemical composition and elements distribution of selected Proterozoic fossil taxa (*Polysphaeroides filiformis*, *Arctacellularia tetragonala*, *Chlorogloeaopsis* spp., *Navifusa majensis*) were analyzed using a combination of techniques. These data enabled to interpret reliably two microfossil taxa as cyanobacteria, *Polysphaeroides filiformis* (Mbuji-Mayi Supergroup, Democratic Republic of the Congo) and *Navifusa majensis* (Tawallah Group, Australia; Shaler Supergroup, Canada). The multicellular branching *P. filiformis* was interpreted as a cyanobacterium belonging to the Stigonematacean family. Moreover, the ultrastructure of *N. majensis* highlighted the oldest thylakoids preserved in fossil cells, bringing a direct evidence for oxygenic photosynthesis. Also, the detection of nickel in intracellular inclusions within fossil cells highlighted the preservation of degraded chlorophyll in the form of Ni-geoporphyrins. Therefore, this thesis proposes two new calibration points for cyanobacterial molecular clocks: 1. a first point (minimum age ~1 Ga) for heterocytous nitrogen-fixing cyanobacteria; 2. a second point (minimum age ~1.75 Ga) for the divergence of thylakoid-bearing cyanobacteria from the thylakoid-less cyanobacteria (*Gloeobacter*). Finally, this work also shows that the study of modern lineages is important for the comparison with microfossils as modern microorganisms may produce compounds exclusively found in a particular group, e.g. cyanobacteria with the production of scytonemin and gloeocapsin, UV-screening cyanobacterial pigments, which could be looked for in microfossils.



## Résumé

Les cyanobactéries forment un groupe d'organismes bien connus pour être impliqués dans l'évolution de la vie et de la terre primitives. Ce sont les seuls procaryotes capables d'effectuer la photosynthèse oxygénique. Grâce à, ou à cause de, ce métabolisme, elles ont participé à l'oxygénation de l'atmosphère et des océans durant la Grande Oxygénation (Great Oxidation Event - GOE), événement s'étant déroulé aux alentours de 2.4 milliards d'années. Cette forte oxygénation a induit le développement de nouvelles niches écologiques oxygénées. De plus, les cyanobactéries sont considérées comme étant l'ancêtre du chloroplaste, organe où se déroule la photosynthèse oxygénique chez les organismes eucaryotes. Le chloroplaste s'est formé durant l'endosymbiose primaire à partir d'une cyanobactérie phagocytée par un eucaryote primitif mais qui n'a pas été digérée. Avec le développement de niches oxygénées durant le GOE et la formation du chloroplaste, les cyanobactéries ont joué un rôle clé dans la diversification des organismes eucaryotes. Par conséquent, au vu de leur importance dans l'évolution de la vie et de la terre primitives, il est important d'étudier les cyanobactéries pour mieux comprendre leur diversification et impact. Néanmoins, malgré leur rôle prépondérant et l'abondance de fossiles décrits comme des cyanobactéries, leur registre fossile univoque reste peu connu. Seulement trois microfossiles du Protérozoïque sont identifiés de manière non ambiguë comme étant des cyanobactéries. Leur identification a pu se faire grâce à un ensemble de critères uniques aux cyanobactéries.

Dans cette thèse, des microfossiles interprétés comme cyanobactéries « probables », c'est-à-dire qui restent ambiguës car leur identification ne porte que sur la morphologie qui peut être rencontrée également chez des eucaryotes et d'autres bactéries, ont été étudiés pour tester leur identification en utilisant de nouveaux critères. Cette thèse se focalise sur l'étude de différents taxa protérozoïques ; *Polysphaeroides filiformis*, *Arctacellularia tetragonala*, *Chlorogloeaopsis* spp., et *Navifusa majensis*. La combinaison de techniques pour caractériser leur morphologie, morphométrie, ultrastructure, composition moléculaire et distribution de certains éléments a permis de confirmer l'identification comme cyanobactérie de deux microfossiles, *Polysphaeroides filiformis* (Supergroupe Mbuji-Mayi, République Démocratique du Congo) et *Navifusa majensis* (Groupe Tawallah, Australie; Supergroupe Shaler, Canada). Le microfossile multicellulaire branchu *P. filiformis* a pu être interprété comme une cyanobactérie appartenant à la famille des Stigonématacées. De plus, l'étude de l'ultrastructure de *N. majensis* a pu mettre en évidence les plus vieux thylakoïdes préservés dans des cellules fossiles et qui sont donc considérés comme une preuve *directe* de la photosynthèse oxygénique. La détection de nickel dans des inclusions intracellulaires présentes dans certaines cellules fossiles a également permis de mettre en évidence la préservation de chlorophylle dégradée sous forme de Ni-géoporphyrines. Deux nouveaux points de calibration pour les horloges moléculaires de cyanobactéries ont pu ainsi être proposés grâce à cette thèse : 1. Un premier point (âge minimum ~1 Ga) pour les cyanobactéries fixant l'azote atmosphérique dans des cellules différenciées appelées hétérocytes, grâce à *P. filiformis* ; 2. Un



second point de calibration (âge minimum ~1.75 Ga) pour la divergence entre les cyanobactéries possédant des thylakoïdes et celles qui font la photosynthèse sans l'aide de ces membranes (de type *Gloeobacter*), grâce à *Navifusa majensis*. Enfin, ce travail montre aussi qu'il est aussi important d'étudier les organismes modernes pour comparaison avec les microfossiles étant donné que certains groupes de micro-organismes modernes produisent des composés uniques à ces groupes, comme par exemple la production de pigments tels que la scytonémine ou la gloeocapsine permettant la protection des cyanobactéries contre les UV, et qui pourraient être recherchés dans les microfossiles.



## Table of contents

<b>Chapter 1. General introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1. Contributions to the review about the cyanobacteria evolution.....	1
1.2. <i>Cyanobacteria evolution: insight from the fossil record</i> .....	2
1.3. Updates since 2019.....	20
1.3.1. Cyanobacterial fossil record .....	20
1.3.2. Biomarkers detection .....	20
1.3.3. References .....	23
<b>Chapter 2. Studied materials</b> .....	<b>27</b>
2.1. Geological context of fossil material .....	27
2.1.1. Belcher Supergroup, Canada .....	27
2.1.2. Mbuji-Mayi Supergroup, Democratic Republic of Congo .....	30
2.1.3. Shaler supergroup, Canada .....	33
2.1.4. Tawallah Group, Australia .....	35
2.1.5. Billyakh Group, Siberia .....	38
2.1.6. Bylot Supergroup (Angmaat Formation), Canada .....	42
2.2. Modern material .....	48
2.2.1. Modern cyanobacteria.....	48
2.2.2. Red alga .....	48
2.3. References .....	49
<b>Chapter 3. <i>Polysphaeroides filiformis</i></b> .....	<b>53</b>
3.1. Contributions to the paper about the microfossil <i>Polysphaeroides filiformis</i> ...	53
3.2. <i>Polysphaeroides filiformis, a proterozoic cyanobacterial microfossil and implications for cyanobacteria evolution</i> .....	54
<b>Chapter 4. Investigating the enigmatic multicellular microfossil <i>Chlorogloeopsis</i></b> .....	<b>75</b>
4.1. Introduction.....	75
4.2. Material and methods .....	76
4.2.1. Material .....	76
4.2.2. Samples preparation .....	76
4.2.3. Optical microscopy.....	76
4.2.4. Transmission electron microscopy .....	77
4.2.5. Fourier transform infrared microspectroscopy.....	77

4.2.6. Raman microspectroscopy .....	78
4.2.7. Synchrotron-based nano X-ray Fluorescence (SR-nanoXRF) .....	78
4.2.8. Micro X-ray Absorption Spectroscopy ( $\mu$ XANES) .....	79
4.3. Results.....	79
4.3.1. Morphology and morphometry .....	79
4.3.2. Ultrastructure.....	81
4.3.3. Paleothermometry.....	84
4.3.4. Chemical composition .....	85
4.3.5. Characterization of the elements distribution and speciation of Ni in ICIs . .....	86
4.4. Discussion .....	88
4.5. Conclusion and perspectives .....	94
4.6. References .....	94
<b>Chapter 5. <i>Navifusa majensis</i> and oldest thylakoids .....</b>	<b>97</b>
5.1. Contributions to the paper about the microfossil <i>Navifusa majensis</i> and the discovery of the oldest thylakoidal membranes preserved .....	97
5.2. <i>Oldest thylakoids in fossil cells directly evidence oxygenic photosynthesis</i> ....	98
<b>Chapter 6. Ni-geoporphyrins detection in <i>Arctacellularia tetragonala</i> .....</b>	<b>111</b>
6.1. Contribution to the detection of intracellular bound chlorophyll residues in isolated microfossils, signature of photosynthesis .....	111
6.2. <i>Intracellular bound chlorophyll residues identify 1 Gyr-old fossils as eukaryotic     algae</i> .....	113
<b>Chapter 7. Growth and observations of akinetes produced by <i>Cylindrospermum alatosporum</i> (SAG 43.79) .....</b>	<b>121</b>
7.1. Introduction.....	121
7.2. Material and methods .....	122
7.3. Results.....	123
7.4. Interests of studying modern akinetes .....	124
7.5. References .....	128
<b>Chapter 8. Characterization of a UV-screening pigment, gloeocapsin pigment .....</b>	<b>131</b>
8.1. Contributions to a study about the characterization of a UV-screening pigment in an extant cyanobacterial strain .....	131
8.2. <i>Characterization of the Halochromic Gloeocapsin Pigment, a Cyanobacterial     Biosignature for Paleobiology and Astrobiology</i> .....	134
<b>Chapter 9. General discussion .....</b>	<b>155</b>
9.1. Early evolution of Cyanobacteria .....	156

9.1.1. Stigonemataceans and nitrogen-fixing heterocytous cyanobacteria ...	156
9.1.2. Divergence between thylakoids-bearing cyanobacteria and the Gloeobacteria-like (thylakoid-less) cyanobacteria .....	158
9.2. Proxies for elucidating the identity of enigmatic organic-walled microfossils	160
9.2.1. Fossil ultrastructure as signature .....	160
9.2.2. Metabolisms as signatures.....	160
9.3. Conclusion and perspectives .....	163
9.4. References .....	166
<b>Appendix .....</b>	<b>172</b>
Chapter 1 .....	172
Chapter 3.....	176
Chapter 4.....	200
Chapter 5.....	218
Chapter 6.....	226
Chapter 8.....	262

