

ORIGINE DE LA VIE

Comment les premiers acides
ribonucléiques ont pu se former sur la
Terre primitive ?

Par Alix Dujardin

Tuteur : Dr M. Rheinstadter

2020 | Master 2 Bio géosciences parcours

Paléontologie, Paléoenvironnement, Patrimoine

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier profondément mon tuteur de stage, Dr M. Rheinstadter, de m'avoir fait confiance, de m'avoir aidée lorsque j'en avais besoin ce qui m'a permis de travailler dans les meilleures conditions possibles. C'est aussi grâce à lui que j'écris mon premier papier scientifique, réalisé en collaboration avec d'autres personnes du laboratoire. Je remercie aussi Renée-Claude Bider qui m'a appris tout ce qu'il y avait à savoir sur ce laboratoire, ainsi que Sebastien Himbert qui m'a accueillie et aidée lors de mes expériences.

Je remercie également le Département Physiques et Astronomie et le Laboratoire Origine de la Vie de l'Université McMaster d'Hamilton, Ontario, Canada, de m'avoir accueillie.

Je voudrais enfin exprimer ma gratitude aux Universités de Rennes et d'Angers ainsi qu'aux responsables de la formation Master en Bio géosciences de m'avoir permis d'effectuer ce stage de cinq mois.

RESUME / ABSTRACT

L'origine de la vie sur Terre reste encore une énigme aujourd'hui, que ce soit la formation de notre matériel génétique ou des premières cellules. De nombreux scientifiques cherchent aujourd'hui à résoudre ce mystère.

Ces recherches ont eu pour but d'accroître les connaissances des différentes conditions nécessaires sur la Terre, comme la température, les radiations, les minéraux, l'atmosphère, etc. permettant la polymérisation d'ARN (acide ribonucléique). Afin d'expérimenter cela, un « *Planet simulator* » ou simulateur d'Origine de la Vie, présent uniquement au Laboratoire d'Origine de la Vie à l'Université de McMaster (Hamilton, ON, Canada), a été utilisé. Il a été possible de contrôler la température, l'humidité, les gaz, la pression et la lumière, pour imiter les conditions atmosphériques de la Terre primitive.

Les résultats ont montré que les premiers acides nucléiques ont sûrement évolué au contact de sel, type chlorure d'ammonium sous bombardement ultra-violet. Ces recherches confirment la théorie selon laquelle les premiers assemblages génétiques se seraient formés dans des petits puits peu profonds subissant des cycles chaud-froid et sec-humide en raison des changements quotidiens / saisonniers. Cependant, il se peut que cette saisonnalité n'ait pas été si périodique. En effet, les résultats obtenus suggèrent que les cycles auraient été interrompus par des saisons ayant une atmosphère chaude et sec qui aurait duré plus longtemps.

The origin of life on Earth is still an enigma, whether it is how genetic material, or the first cells were formed. A lot of scientists are trying to resolve this mystery.

The aim of this study is to further investigate the different conditions necessary on the Earth, such as temperature, radiations, minerals, atmosphere, etc. to allow RNA (ribonucleic acid) polymerization. To experiment this, a Planet Simulator, only present at the McMaster University's Origin of Life laboratory (Hamilton, ON, Canada), was used. Using it, it has been possible to control temperature, humidity, gases, pressure, and lights to mimic the atmospheric conditions on primitive Earth.

These results show that the first nucleic acids have surely evolved in contact with salt, like ammonium chloride, under ultraviolet light bombardment. This study confirms the theory stating that the first genetic assemblages were formed in small shallow wells undergoing hot-cold and wet-dry cycling due to daily / seasonal changes. However, it is possible that this seasonality was not periodic. Indeed, results suggest that the cycles would have been interrupted by seasons with a hot and dry atmosphere that would have lasted longer.

SOMMAIRE

I.	Introduction.....	1
II.	Matériels et Méthodes.....	2
1.	Préparation des échantillons.....	2
2.	Le simulateur d'Origine de la Vie.....	3
3.	Microscopie.....	4
4.	Spectroscopie UV-visible.....	4
5.	Préparation du gel d'électrophorèse.....	5
6.	Analyse du gel d'électrophorèse.....	6
III.	Résultats.....	7
1.	Composition des petits étangs chauds.....	7
2.	Rôle des ultra-violets.....	8
a.	Microscopie.....	8
i.	Mélange AMP / UMP / DMPC.....	9
ii.	Mélange AMP / UMP / NH ₄ Cl.....	9
iii.	Mélange AMP / UMP / NH ₄ Cl / DMPC.....	10
b.	Analyse des gels d'électrophorèse.....	11
3.	Détermination du rapport chlorure d'ammonium / nucléotides.....	13
4.	Augmentation du nombre de cycles.....	14
5.	Blocage des cycles sur chaud / sec et froid / humide.....	15
a.	Chaud / sec.....	15
b.	Froid / humide.....	16
IV.	Discussion.....	17
V.	Conclusion.....	19
	Bibliographie.....	20
	Annexes.....	21

I. INTRODUCTION

Comprendre l'origine de la formation de notre matériel génétique est une des questions les plus fondamentales en sciences. Une théorie supporte le fait que les premiers stades de la vie ont été gouvernés par un monde ARN (acide ribonucléique) (Gilbert, 1986). Cette théorie est davantage supportée depuis la découverte de l'autoréplication de l'ARN par Cech et Bass (1986) et Altman *et al.* (1986). Cependant, la mise en place de ce processus n'est pas encore établie.

Il est aujourd'hui admis que l'origine du vivant date du Paléoarchéen (-3,6 Milliards d'années ; -3,2 Milliards d'années), la datation exacte reste encore incertaine puisque depuis cette époque, la Terre a été considérablement altérée (Javaux, 2019). L'environnement est encore débattu mais des recherches ont montré que la mer devait être chargée en chlorure de sodium, en fer, en calcium et en magnésium. Le pH était beaucoup plus acide, de l'ordre de 5 à 6. Les températures sur Terre étaient extrêmes mais inférieures à 100°C puisque de l'eau sous forme liquide y était présente (Deamer, 2012). En plus de ces paramètres à prendre en compte, il ne faut pas négliger le fait qu'il a été nécessaire d'avoir des environnements variants cycliquement, particulièrement la température et l'humidité. La partie chaud / déshydratation des cycles permettrait de donner l'énergie nécessaire pour former des liaisons phosphodiester entre les nucléotides et ainsi former des polymères. La partie froid / hydratation des cycles, quant à elle, aurait aidé à la réorganisation des polymères de sorte que, lors du cycle de déshydratation suivant, ceux-ci auraient pu s'ordonner en chaînes plus longues grâce à d'autres brins de polymères ou des monomères libres présents à proximité (Damer & Deamer, 2015). Cela semble indiquer un environnement de surface comme des petits étangs chauds plutôt que les profondeurs marines comme les sources hydrothermales (Damer, 2016 ; Pearce *et al.*, 2017).

La formation des premiers ARN s'est faite grâce à l'environnement qui était présent. D'autres éléments que les cycles hydratation-déshydratation ont pu jouer un rôle dans la polymérisation comme les surfaces minérales. Des recherches ont montré que l'argile aurait pu intervenir dans la formation des pré-ARN. Effectivement, grâce à leur terminaison carbone négative, les acides aminés sont adsorbés sur les surfaces argileuses. Après une déshydratation partielle, une énergie est requise favorisant les réactions de condensation qui permettent la formation de liaisons phosphodiester (Erastova *et al.*, 2017). D'autres recherches se sont intéressées au rôle des lipides dans la polymérisation des proto-ARN. D'après leurs résultats, lors d'une phase de réhydratation, les lipides se forment en micelles, piégeant alors les nucléotides, favorisant la formation de peptides. Lors de la phase de réhydratation, ces micelles se transforment en vésicules qui encapsulent les polymères formés (Toppozini *et al.*, 2013).

Pour saisir davantage comment les premiers ARN se sont formés, plusieurs conditions environnementales plausibles ont été testées grâce au *Planet Simulator*, ou simulateur d'origine de la vie, présent uniquement dans le laboratoire d'Origine de la Vie à l'Université McMaster (Hamilton, ON, Canada). Les échantillons ont été soumis à des cycles de déshydratation (chaud, sec) et de réhydratation (froid, humide) dans le simulateur en présence de nucléotides et de différents éléments possiblement présents sur la Terre primitive, comme l'argile, les lipides mais aussi différents types de sels. Une fois ces éléments étudiés, différents tests ont été réalisés afin d'optimiser la polymérisation de l'ARN en fonction de l'environnement extérieur.

II. MATERIELS ET METHODES

1. Préparation des échantillons

Les nucléotides et lipides, sels, argile ont été mixés avec différents rapports molaires. Les différents types de nucléotides ont été introduits ensemble avec un rapport molaire 1:1. Les lipides ont été mélangés aux nucléotides avec un rapport molaire 1:1 ; l'argile a été introduite avec un rapport molaire de 4:1 (argile : nucléotides) ; les sels ont été incorporés aux nucléotides avec un rapport molaire de 2:1 (sel : nucléotides).

Toutes les concentrations des solutions mères sont récapitulées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Liste des éléments utilisés avec leur concentration mère.

Eléments	Concentration mère (mg/mL)
Adénosine 5'-monophosphate monohydrate (AMP) (C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P)	10,24
Uridine 5'-monophosphate (UMP) (C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₉ P)	9,56
Cytidine 5'-monophosphate (CMP) (C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₈ P)	9,53
Guanosine 5'-monophosphate disodium salt hydrate (GMP) (C ₁₀ H ₁₂ N ₅ Na ₂ O ₈ P)	10,71
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)	10,00
1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)	10,00
Argile montmorillonite ((Na,Ca) _{0,3} (Al,Mg) ₂ Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂)	10,62
Chlorure d'ammonium (NH ₄ Cl)	1,57
Chlorure de magnésium (MgCl ₂)	2,80
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	3,27
Chlorure de sodium (NaCl)	1,72
Sulfate de potassium (K ₂ SO ₄)	5,14
Hydroxyde de potassium (KOH)	1,65

Une solution mère de AMP (Annexe 1) de concentration 10,24 mg/mL (Sigma-Aldrich), initialement en poudre, a été diluée avec de l'eau ultrapure (18.2 MΩ.cm). La solution a ensuite été placée dans le sonicateur pendant environ 15 minutes avec une pulsation de 10 secondes et un repos de 15 secondes. La solution devient transparente. Ce protocole a été répété avec les solutions mères de CMP (Fig. 2) et GMP (Fig. 2) (Sigma-Aldrich).

Une solution d'UMP (Annexe 1) de concentration 9,56 mg/mL (Sigma-Aldrich), initialement sous forme de cristal, a été réalisée en ajoutant de l'eau ultrapure. Les cristaux ont été dilués en vortexant la solution pendant 10 secondes. Les solutions d'AMP et d'UMP ont ensuite été mélangées avec un ratio molaire 1:1, signifiant que le même volume de chaque solution a été mélangé, le tout a ensuite été vortexé pendant 10 secondes pour homogénéiser la solution.

Les solutions de nucléotides ont été établies en utilisant leur solubilité maximum. Les concentrations des solutions mères de lipides, sels et argile ont été choisies de manière que les solutions mères de nucléotides restent cohérentes.

Une solution mère de 10 mg/mL de DMPC (Annexe 1) (Aventi polar lipids, Inc) a été préparée avec de l'eau ultrapure. Pour homogénéiser la solution, celle-ci a été vortexée pendant environ 10 secondes. Ce processus a été répété avec la solution mère de DPPC (Annexe 1).

Une solution mère de chlorure d'ammonium à 1,57 mg/mL (99,5% de pureté, Caledon) a été préparée en mélangeant les cristaux de chlorure d'ammonium avec de l'eau ultrapure et vortexée

pendant 10 secondes pour dissoudre les cristaux. Ce protocole a été répété avec le chlorure de calcium, le sulfate de potassium, le chlorure de magnésium, l'hydroxyde de potassium, le chlorure de sodium.

La solution d'argile montmorillonite (Annexe 1) (Montmorillonite K10, Sigma Aldrich, Numéro CAS 1318-93-0) a été réalisée pour avoir une concentration mère de 10,62 mg/mL. Cette solution a été introduite dans le sonicateur pendant 15 minutes, avec une pulsation de 10 secondes toutes les 15 secondes, pour casser toutes les grosses particules et homogénéiser la solution. Il est important de noter que les argiles montmorillonites varient en fonction des quantités de fer, de magnésium et d'aluminium. Cela pourrait affecter la formation de toutes macrostructures et la distribution des lipides et nucléotides, de sorte que les résultats de cette étude sont spécifiques à l'argile utilisée dans ces expériences.

Pour tester l'habilité des différentes mixtures à synthétiser de l'ARN, toutes les solutions mères ont été mélangées avec le même volume. Ces mélanges ont ensuite été vortexés pendant 10 secondes pour assurer l'homogénéisation de la solution.

Travaillant sous une enceinte de biosécurité, une lame en verre (United Scientific supplies, Inc) (75 mm × 25 mm × 3 mm) contenant trois puits, chacun pouvant contenir 300µL de liquide, a été immergée dans du dichlorométhane pendant approximativement 20 minutes pour dissoudre tous les composés organiques. La lame a été rincée en alternant 5 mL de méthanol, pour enlever les particules hydrophobes, et de l'eau ultrapure pour éliminer le méthanol. La lame a ensuite été séchée avec un flux d'air de nitrogène et placée sur une plaque chauffée à 85°C. Les solutions ont ensuite été pipetées et placées dans chaque puit, de telle sorte que chaque expérimentation soit répliquée trois fois. Le volume pipeté a varié en fonction de l'expérimentation réalisée, cependant, chaque série d'expériences avait un nombre uniforme de nucléotides.

2. Le simulateur d'Origine de la Vie

Les lames ont ensuite été introduites dans le simulateur d'Origine de la Vie (Fig. 1) (« *planet simulator* », (Angstrom Engineering, Kitchener, Ontario, Canada)), dans une chambre de simulation sur mesure se trouvant dans le laboratoire d'Origine de la Vie à l'Université McMaster. Le simulateur peut réguler la température (de -20 à +120°C), l'humidité (de 0 à 100% d'humidité relative (RH)), la composition atmosphérique (quatre lignes de gaz), le taux de radiation (de 155 à 1000 nm) et la pression

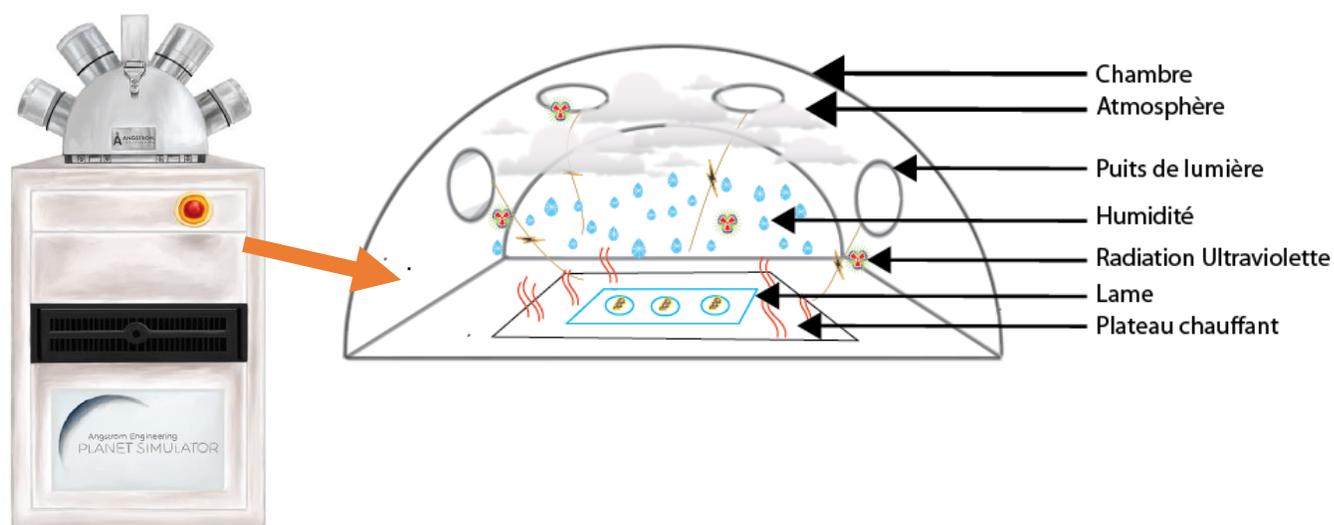


Figure 1 : Esquisse du simulateur d'Origine de la Vie ("Planet Simulator") ainsi que l'intérieur de la chambre

(de 0 à 750 Torr). Le simulateur peut prendre en compte des formules pouvant inclure plusieurs étapes en contrôlant ces paramètres. Ces étapes peuvent être répétées en boucle.

Le simulateur a d'abord été calibré pour une humidité relative de 40% et une température de 30°C pour la chambre et le plateau. Un cycle comprend une phase de déshydratation et d'hydratation. Afin de réaliser la phase de déshydratation, la température du plateau augmente jusqu'à atteindre 90°C et la température de la chambre s'élève à 85°C, tandis que l'humidité relative diminue jusqu'à atteindre 10%. Pour réussir une phase d'hydratation, la température de la chambre diminue jusqu'à 30°C, la température du plateau diminue jusqu'à 10°C, alors que l'humidité relative augmente, atteignant 90%. En plaçant la température en dessous du point de rosée, cela induit une condensation naturelle sur l'échantillon. Les étapes de déshydratation et d'hydratation ont été répétées, créant ainsi des cycles. Tout au long des expériences, la pression est restée ambiante alors que l'atmosphère était saturée en azote pour empêcher toute réaction d'oxydation de se produire. Les paramètres d'un cycle sont présentés dans le tableau 2. Les échantillons sont restés dans le simulateur pendant une durée de 14 à 25 cycles.

Tableau 2 : Paramètres du simulateur d'Origine de la Vie pour un cycle. Tous les cycles ont été réalisés dans une atmosphère saturée en azote et à pression ambiante.

Etapes	Température de la chambre (°C)	Température de la platine (°C)	Humidité (% R.H)
1	30	30	40
2	30	10	40
3	98	90	10
4	30	30	40

3. Microscopie

Les images de microscope optique et à fluorescence ont été réalisées en utilisant un microscope Eclipse LV100 ND de Nikon. L'instrument est équipé avec un objectif 50X Tu Plan Fluor avec une ouverture numérique de 0,8. Les images sont enregistrées avec un appareil photo Nikon DS-Ri2 ayant une résolution de 4908 X 3264 pixel et une taille de pixel de 7,3 X 7,3 μm^2 . L'appareil photo est monté via un 2,5X du télescope au microscope. Toutes les images sont enregistrées en mode d'éclairage épiscopique à l'aide d'une lampe halogène. Grâce à la grande ouverture numérique, l'objectif a une faible profondeur de champ, entre 0,7 et 0,9 μm . Afin d'enregistrer une image uniforme et nette, le logiciel de contrôle Nikon (NIS Elements, 275 Version 4.60.0) a été utilisé pour enregistrer une image à profondeur de champ étendue en combinant plusieurs images avec les plans focaux différents. Des images au filtre champ clair, champ sombre et fluorescent ont été prises pour les échantillons. Un filtre d'émission B-2A a été utilisé avec une longueur d'excitation de 450-490 nm et un filtre d'analyse avec une longueur d'onde barrière de 520 nm. Grâce à leur auto-fluorescence, les nucléotides s'illuminent avec le filtre fluorescent. Les phospholipides, l'argile et les sels, en revanche, émettent à peine un signal fluorescent, de sorte que les régions enrichies en nucléotides peuvent être identifiées sur l'image fluorescente.

4. Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible a été menée en utilisant un nanophotomètre (IMPLEN NP80). De l'eau a été utilisée pour réaliser le blanc. 1 μL a été utilisé pour mesurer la quantité nucléotidique de chaque

échantillon. Un balayage sur plusieurs longueurs d'onde (de 200 à 800 nm) a été mesuré et normalisé, permettant de déterminer la concentration en nucléotides, donné en ng/ μ L par le nanophotomètre. Travaillant avec des brins d'ARN très courts, cette étape a été déterminante pour confirmer la présence de nucléotides avant de faire tourner le gel d'électrophorèse. Le nanophotomètre était souvent saturé, indiquant une forte concentration de nucléotides. Les résultats du nanophotomètre peuvent permettre d'expliquer l'absence de résultat.

5. Préparation du gel d'électrophorèse

La précipitation d'ARN ou d'ADN suivie d'une électrophorèse sur gel polyacrylamide est une pratique courante pour déterminer la longueur des brins synthétisés. L'électrophorèse permet de séparer des solutés chargés par migration dans un champ électrique. La migration dépend de la charge de la molécule. Les réticulations dans le gel sont créées par l'intermédiaire des molécules d'acrylamide qui se lient entre elles lors de la polymérisation. Le pourcentage d'acrylamide et la proportion acrylamide/*bis*-acrylamide conditionnent la résolution du gel. En condition dénaturante (perte de la conformation tridimensionnelle de la molécule), ce gel permet de détecter de petits fragments d'acide nucléique (Coumoul *et al.*, 2016).

Dans le but d'augmenter la performance de l'électrophorèse, l'ARN a d'abord été extrait des échantillons provenant du simulateur d'Origine de la Vie. Pour récupérer les échantillons présents dans les puits des lames en verre, 700 μ L d'une solution d'éthanol à 70% a été préparée et introduite dans un tube Eppendorf de 1,7 mL (Diamed). 100 μ L de cette solution a été déposée dans les puits. La surface de l'échantillon a ensuite été délicatement grattée avec l'embout de pipette. La solution a ensuite été récupérée avec l'échantillon dissous puis déposée dans le même tube Eppendorf. Cette procédure a été répétée au moins trois fois, jusqu'à ce que les puits paraissent clairs et propres.

Pour précipiter l'ARN, 20 μ L d'une solution d'acétate 3M et 1 μ L de glycogène ont été ajoutés dans le tube Eppendorf contenant déjà les échantillons dissous dans 700 μ L d'éthanol 70%. Du glycogène est généralement ajouté à la solution d'éthanol si les concentrations d'ARN ou d'ADN sont très faibles. Le glycogène, un polymère de glucose hautement ramifié, est insoluble dans l'éthanol et forme un précipité en présence de sels. En précipitant, il piège les acides nucléiques, agissant comme un support et augmentant le rendement de précipitation.

L'ensemble de la solution a ensuite été homogénéisée par vortex puis introduit dans un congélateur à -20°C pendant 12 heures. Généralement, la précipitation de l'ADN ou de l'ARN par l'éthanol nécessite une congélation de deux heures, mais dans le but d'améliorer la précipitation, le temps de congélation a été augmenté. Une fois ce temps écoulé, les tubes ont été centrifugés à 13 000 rpm (rotation par minute), à -2°C pendant 20 minutes. Le surnageant a ensuite été enlevé et remplacé par 100 μ L d'une solution d'éthanol à 70%, dans le but de dissoudre tous les sels restants, alors que pour les échantillons contenant des lipides, ceux-ci sont restés dissous dans le surnageant. Les échantillons ont à nouveau été centrifugés avec les mêmes paramètres pendant 5 minutes. De nouveau, le surnageant a été retiré, tel que seul le précipité d'ARN reste. Le précipité a été séché sous un flux d'azote jusqu'à ce que l'éthanol ait été évaporé.

Afin de préparer les échantillons pour le gel d'électrophorèse, 20 μ L d'eau ultrapure, 2 μ L de colorant de charge et 1 μ L de glycérol 30% ont été ajoutés dans le tube Eppendorf avec le précipité. Le mélange a ensuite été vortexé pour dissoudre l'ARN. Pour dénaturer les structures secondaires de l'ARN, les tubes ont été plongés pendant 1 minute dans un bain à 90°C et refroidis pendant 5 minutes. 1 μ L de chaque échantillon a ensuite été introduit dans nanospectromètre pour vérifier la teneur en acide nucléiques.

Dans le même temps, les plaques pour le gel d'électrophorèse ont été nettoyées en alternant méthanol et eau ultrapure pour éliminer tous les contaminants, hydrophobes et hydrophiles. Deux séparateurs de 3 mm ont été introduits entre les deux plaques. Le tout a ensuite été clampé avec deux paires de pinces.

Un gel de polyacrylamide 40% a été réalisé afin de séparer les courts brins d'ARN. Les gels de polyacrylamide, pour visualiser de l'ARN et d'ADN, sont généralement préparés à des concentrations allant de 5 à 10%. Ce protocole est conçu pour la visualisation de longs brins de matériel génétique tels que des gènes entiers mais il est peu efficace pour des brins plus courts.

28,8 g d'urée (BioShop) (molécule dénaturante) ont été mélangées à 6 mL de TBE Buffer 10X (BioShop) et à 30 mL d'acrylamide 40% (29:1) (BioShop). Le tout a été placé sur une plaque chauffée à 50°C avec un agitateur magnétique tournant à 450 rpm permettant de dissoudre l'urée. Une fois l'urée dissoute, 199,2 µL d'APS (persulfate d'ammonium) et 24 µL de TEMED (Tétraméthyléthylènediamine) ont été ajoutés et le liquide a été versé entre les deux plaques. Une fois celui-ci bien reparti, un peigne contenant 20 dents (chacune mesurant 4,5 mm) a été ajouté. Le gel est laissé polymérisé pendant environ 20 minutes. Une fois solidifié, les plaques contenant le gel ont été clampées à l'électrophorèse verticale (C.B.S scientifique) et une plaque en aluminium a été clampée derrière permettant de distribuer la chaleur, assurant la migration à vitesse constante de chaque échantillon. Le peigne a ensuite été enlevé et du tampon TBE 1X a été placé dans le haut et le bas du bain de l'électrophorèse, couvrant les puits et le haut du gel. À l'aide d'une aiguille, les puits ont été nettoyés pour enlever toute solution de polyacrylamide qui serait en excès et qui pourrait déformer les puits à l'aide du tampon TBE 1X. Enfin, le gel a pré-tourné pendant 15 minutes ou plus à 3000 volts, 400 mA et 20 watts. Avant d'ajouter les échantillons dans les puits, ceux-ci sont à nouveau rincés avec le tampon pour éliminer l'urée qui aurait pu s'accumuler.

20 µL d'échantillons ont été placés dans chaque puits avec une pipette de 200 µL à embout plat de 0,4 mm d'épaisseur (Sigma-Aldrich), de telle sorte qu'il n'y ait qu'une seule expérience par puit. Des échelles de 100pb (paire de base) (dsRNA Ladder) et de 21pb (microRNA Marker) ont aussi été ajoutées dans deux puits différents. Les échantillons ont ensuite tournés dans l'électrophorèse à une puissance constante de 20 watts pendant environ 1h30.

L'amélioration de ce protocole de préparation des gels d'électrophorèse, utilisé dans ces expérimentations a été optimisé à partir du manuel Li Lab (Jimmy, 2018) afin d'accroître la résolution du gel pour les brins courts.

6. Analyse du gel d'électrophorèse

Pour analyser les résultats, le gel a été plongé dans un bain contenant 300 mL de tampon TBE 1X et 3µL de *SYBR Gold nucleic acid per stain* (Life Technologies Corporation ; 10,000X concentré en DMSO) permettant une haute visualisation des acides nucléiques puisqu'il s'agit d'un agent intercalant d'ADN et d'ARN, pendant 10 minutes ou plus. Ensuite, le gel a été placé dans une chambre noire à lumière ultraviolette permettant de visualiser la migration de l'ARN en excitant le SYBR Gold.

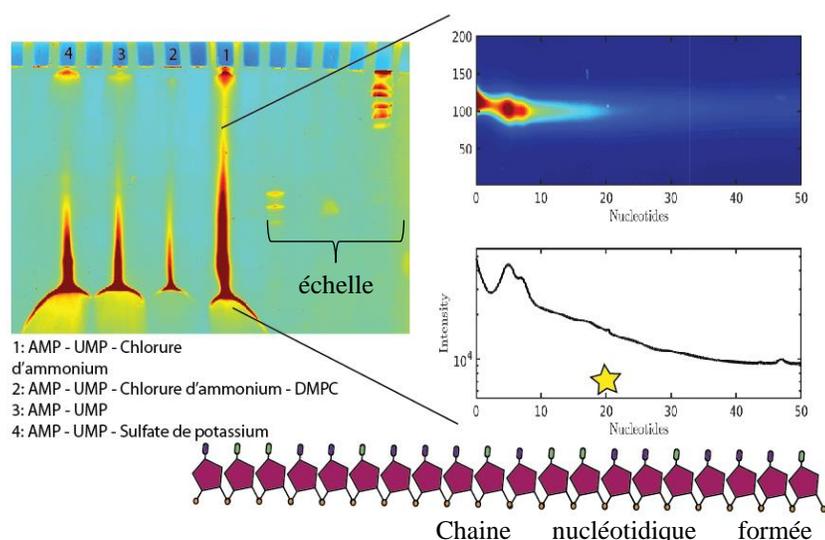


Figure 2 : Gel d'électrophorèse colorisé et analyse de l'intensité d'un échantillon par le logiciel Matlab.

Un programme a été réalisé sur MatLab pour connaître le nombre de nucléotides dont l'ARN est formé puisque la migration ne se fait pas de façon linéaire mais de façon exponentielle. Dans un premier temps le programme permet de choisir la figure à exploiter, qui a été enregistrée par l'intermédiaire de la chambre noire à lumière ultraviolette. Puis, le logiciel a analysé l'intensité du gel. Il a ensuite fallu calibrer, c'est-à-dire que le programme a été réalisé pour pouvoir cliquer sur les échelles (150 ; 80 ; 25 ; 21 ; 0), pour connaître la longueur de l'ARN qui créait un pic d'intensité. La chaîne la plus longue pouvant être détectée sur le gel est donc de 150

nucléotides. Enfin, chaque colonne de migration a été analysée, donnant un profil graphique, permettant de connaître parfaitement la longueur de l'ARN qui a été formé lors de l'expérience (Fig. 2). L'affirmation de la formation d'ARN se fait lorsque l'intensité est supérieure à 1,5. En dessous de ce point, l'intensité lumineuse pourrait être un artéfact, un résidu de l'ARN qui aurait migré.

III. RESULTATS

1. Composition des petits étangs chauds

Plusieurs combinaisons de sels, lipides, argile et nucléotides ont été réalisées pour tester l'habilité des nucléotides à synthétiser de l'ARN dans différentes conditions.

Toutes les combinaisons testées sont répertoriées dans la figure 3, montrant la longueur des chaînes nucléotidiques formées en fonction des différents mélanges expérimentés. Certains mélanges ayant été réalisés plusieurs fois, seuls les premiers résultats apparaissent dans cette figure.

Le mélange pur de nucléotides AMP et UMP, qui a tourné pendant 19 cycles, a formé au maximum une chaîne de 9 nucléotides. Le mélange pur de nucléotides AMP, UMP, GMP, CMP n'a pas formé de chaîne polynucléotidique.

Le mélange chlorure d'ammonium (NH_4Cl), chlorure de sodium (NaCl), chlorure de magnésium (MgCl_2), sulfate de potassium (K_2SO_4), AMP et UMP a produit une chaîne de 15 nucléotides après 17 cycles. Cependant, il a été remarqué que, individuellement, tous ces sels ne produisent pas la même longueur de chaînes nucléotidiques. Effectivement, le chlorure de sodium et le chlorure de magnésium ne produisent pas de chaîne nucléotidique après 19 cycles. Le sulfate de potassium, après 14 et 25 cycles produit un ARN de 8 nucléotides. Tandis qu'après 19 cycles, le chlorure d'ammonium produit un ARN de 15 nucléotides comme le mélange de tous ces sels. Cependant, en ajoutant du DMPC au mélange, aucune chaîne n'a été formée. Effectivement, les mélanges de nucléotides AMP, UMP et les lipides (DMPC et DPPC) n'ont pas donné de résultats. Deux autres sels ont aussi été testés mais n'ont pas donné de résultats après avoir tourné 14 cycles dans le simulateur : le chlorure de calcium (CaCl_2)

et l'hydroxyde de potassium (KOH). Un mélange chlorure de magnésium et DMPC a aussi été testé mais n'a pas donné de résultat après 16 cycles.

Avec l'argile montmorillonite, la chaîne de nucléotides n'a atteint que 5 nucléotides après 16 cycles. En ajoutant du DMPC, aucun ARN n'a été formé après le même nombre de cycles.

Le chlorure de magnésium ayant donné le meilleur résultat, d'autres mélanges ont été réalisés avec ce sel. Cependant seul un mélange sur cinq a permis de former une chaîne polynucléotidique : l'ensemble AMP, UMP, chlorure d'ammonium et chlorure de magnésium a formé une chaîne de 5 nucléotides après 16 cycles. Les autres mélanges avec CMP, GMP ; argile montmorillonite ; DMPC ; chlorure de magnésium, DMPC ; sulfate de potassium n'ont donné aucun résultat.

Le sulfate de potassium ayant donné un résultat de 8 nucléotides, deux autres mélanges ont été testés, l'un avec du DMPC et l'autre avec du chlorure de calcium, les deux ayant tourné 17 cycles dans le simulateur mais ces mélanges n'ont pas dépassé une chaîne de 2 nucléotides.

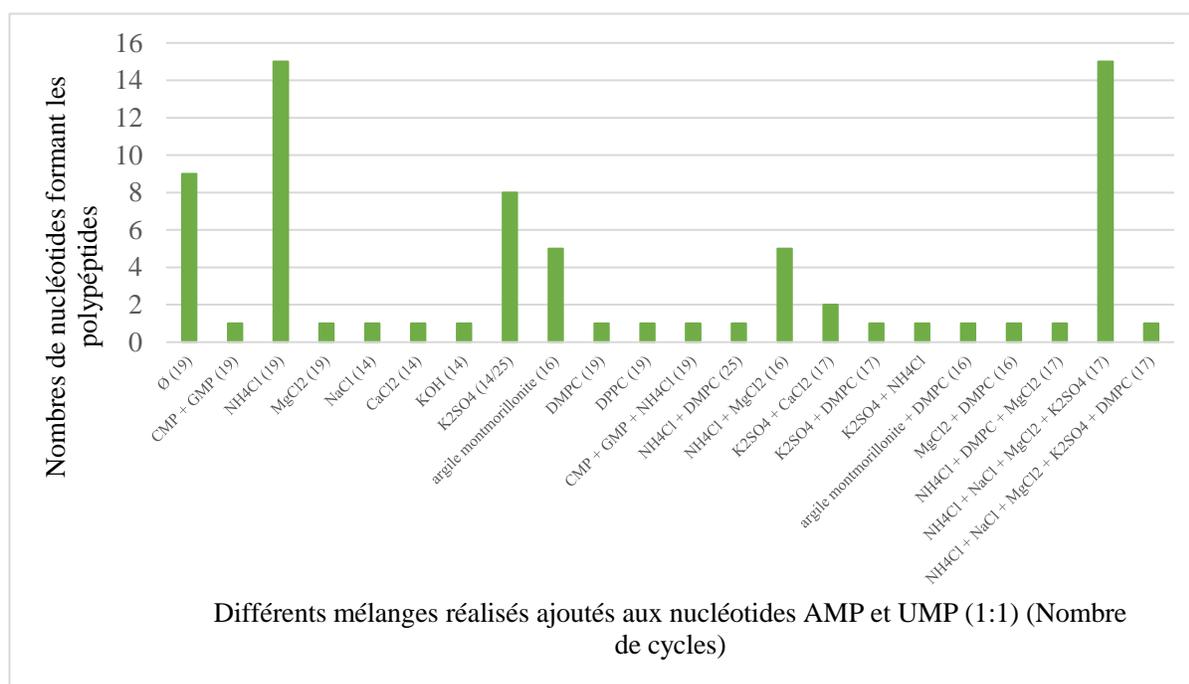


Figure 3 : Nombre maximum de nucléotides formant le peptide d'ARN en fonction des différents mélanges réalisés et du nombre de cycles.

D'après l'ensemble de ces tests, seul le mélange AMP, UMP et chlorure d'ammonium a donné des résultats probants.

2. Rôle des ultra-violets

a. Microscopie

Il a voulu être testé l'hypothèse que les ultra-violets (UV) auraient pu avoir un lien dans la formation de l'ARN. Pour se faire, trois mélanges ont été observés sous microscope optique avec et sans UVB (290 à 320 nm) et UVC (100 à 290 nm) : AMP / UMP / DMPC (Fig. 4), AMP / UMP / NH₄Cl (Fig. 5), AMP / UMP / NH₄Cl / DMPC (Fig. 6).

Les images ont été prises au filtre champ clair, champ sombre et fluorescent du mélange séché sur la lame de verre.

i. Mélange AMP / UMP / DMPC

Avant les cycles (Fig. 4a), le mélange séché forme une mixture homogène. En analysant l'image sous filtre fluorescent (Fig. 4b), il est possible de voir que les nucléotides sont uniformément répartis à travers le mélange. Les taches légèrement plus intenses proviennent de nucléotides pris dans de petites cavités, qui deviennent visibles avec le filtre champ sombre (Fig. 4c). Les variations de hauteur de la surface correspondent à une élévation de 4 μm au maximum.

Des structures circulaires deviennent visibles après 15 cycles sans lumière UV (Fig. 4d). Le diamètre de ces structures varie de 16 à 22 μm en moyenne. Les images prises avec le filtre fluorescent (Fig. 4e) paraissent significativement différentes : les nucléotides et les potentiels polymères d'ARN commencent à se concentrer autour de ces structures circulaires, indiqués par la forte intensité verte, mais ils ne se concentrent pas à l'intérieur. Ces structures sont aussi visibles au filtre sombre (Fig. 4f) et présentent des circonférences bien développées et prononcées. Les nucléotides sont concentrés dans les creux. Effectivement, la surface est très irrégulière, le point le plus haut étant à 8 μm du point le plus bas.

La présence des lumières UV semble inhiber la formation des structures circulaires (Fig. 4g et 4i). Toutefois, quelques rugosités à la surface sont observées, formant des sortes de vallées. Les nucléotides (Fig. 4h) sont présents en dehors de ces vallées, à l'intérieur des cavités, visibles avec le filtre sombre (Fig. 4i).

ii. Mélange AMP / UMP / NH_4Cl

Les images du mélange nucléotides / chlorure d'ammonium présent avant les cycles apparaissent beaucoup plus lisses (Fig. 5a et 5c) qu'avec le mélange lipidique. Quelques fissures sont observées, d'une hauteur de 3 μm en moyenne. Quelques petits points, entre 2 et 4 μm de diamètre ressortent très visibles avec le filtre sombre (Fig. 5c). L'image prise au filtre fluorescent montre une distribution homogène des nucléotides (Fig. 5b).

Après 15 cycles (Fig. 5d), des cristaux deviennent visibles avec des arêtes bien prononcées et nettes. Les plus petits font en moyenne 25 μm de côté et sont relativement plats, d'une hauteur de 1,5 μm . Les plus gros sont en moyenne de 46 μm de côté et sont plus hauts, hauteur de 4,4 μm . Les nucléotides et les polymères d'ARN sont accumulés autour de ces cristaux (Fig. 5e), visibles grâce à la forte fluorescence verte. Les images prises au filtre sombre (Fig. 5f) montrent que les contours de ces cristaux sont plus hauts que le centre.

La présence de lumière UV semble inhiber la formation de ces cristaux (Fig. 5g et 5i). Seul de petits points sont visibles, avec deux grandes structures circulaires, beaucoup moins structurées qu'en absence de radiation UV. Cependant, les nucléotides se sont rassemblés dans ces points surélevés (Fig. 5h).

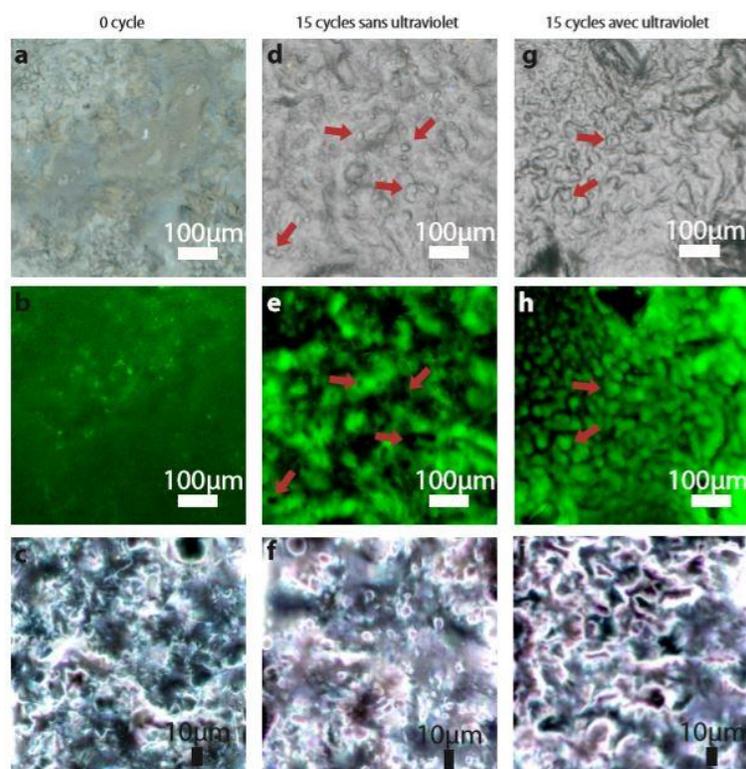


Figure 4 : Images du mélange AMP, UMP ($7.37.10^{-7}$ mol), DMPC ($7.37.10^{-7}$ mol) prises au microscope optique. a) d) f) filtre clair ; b) e) h) filtre fluorescent ; c) f) i) filtre sombre.

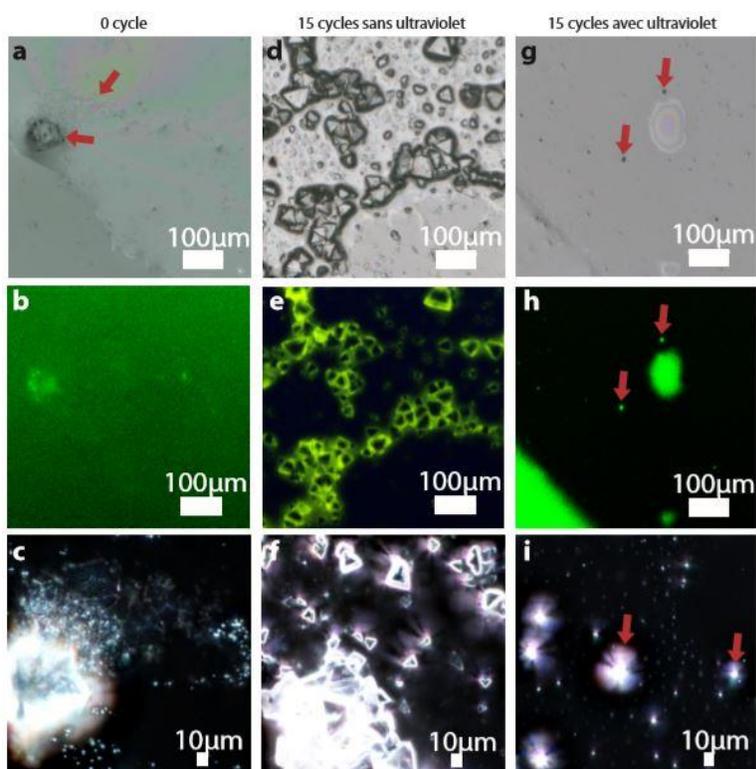


Figure 5 : Images du mélange AMP, UMP ($7.37.10^{-7}$ mol) et chlorure d'ammonium ($1.47.10^{-6}$ mol) prises au microscope optique. a) d) f) filtre clair ; b) e) h) filtre fluorescent ; c) f) i) filtre sombre.

iii. Mélange AMP / UMP / NH₄Cl / DMPC

L'ajout de DMPC au mélange a changé l'évolution de la structure. Avant les cycles (Fig. 6a), la surface est relativement lisse, similaire au mélange avec le chlorure d'ammonium mais sans le DMPC. Quelques irrégularités sont visibles sur les images prises avec le filtre sombre (Fig. 6c). Les nucléotides semblent être répartis uniformément sur la surface (Fig. 6b).

Après 15 cycles sous lumière visible, quelques cristaux sont visibles (Fig. 6d) mais beaucoup moins prononcés que dans le mélange sans DMPC et beaucoup plus petits, de 19 à 26 μm de côté. La distribution des nucléotides est hétérogène et l'intensité de fluorescence est faible (Fig. 6e). Des cavités sont visibles sur les images prises au filtre sombre (Fig. 6f), de 3 μm de profondeur pour toutes, exceptées celles concentrées en bas de l'image qui sont réparties sur une surface irrégulière allant de 8 μm à 16 μm de haut.

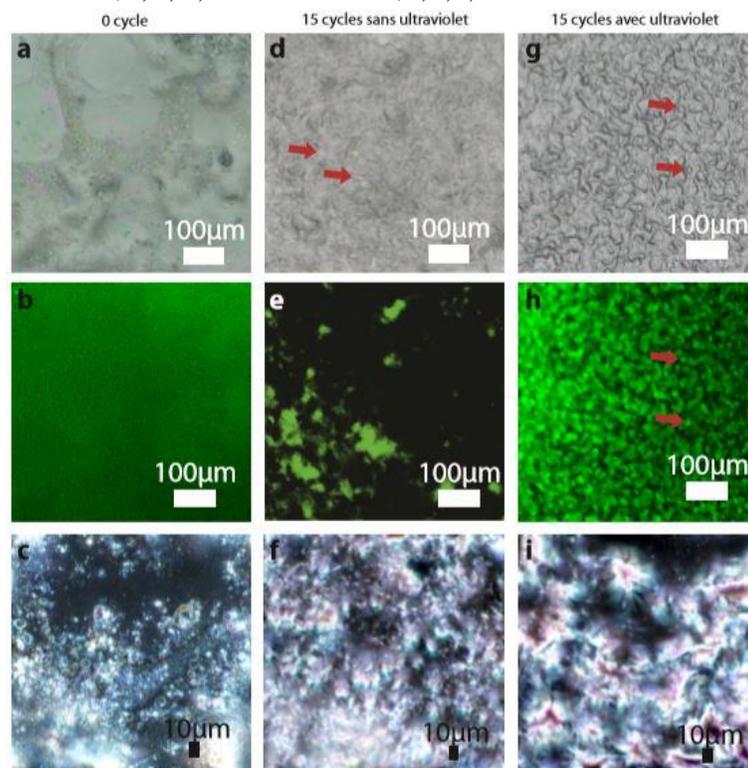


Figure 6 : Images du mélange AMP, UMP ($7.37.10^{-7}$ mol), DMPC ($7.37.10^{-7}$ mol) et chlorure d'ammonium ($1.47.10^{-6}$ mol) prises au microscope optique. a) d) f) filtre clair ; b) e) h) filtre fluorescent ; c) f) i) filtre sombre.

En présence de radiations UV, la surface devient serpentée par des vallées (Fig. 6g). Les nucléotides sont concentrés dans les dépressions (Fig. 6h et 6i), profondes de 3 μm , et non sur les sommets, hauts de 2 μm . L'intensité de fluorescence est plus intense que sans DMPC.

b. Analyse des gels d'électrophorèse

Plusieurs gels ont été réalisés par électrophorèse et améliorés grâce au programme créé sur MatLab afin de comparer la longueur de l'ARN formé avec ou sans lumière UV, après 25 cycles, pour quatre mélanges différents : AMP / UMP (Fig. 7), AMP / UMP / DMPC (Fig. 8), AMP / UMP / NH_4Cl / DMPC (Fig. 9) et AMP / UMP / NH_4Cl (Fig. 10).

La figure 7 montre les résultats du mélange de nucléotides pure AMP / UMP (1:1) avec et sans radiation UV. Sans UV (Fig. 7a), un pic d'intensité est observé à 8 nucléotides. L'intensité décroît progressivement jusqu'à environ 15 nucléotides, ce qui indique la présence de chaînes plus longues. La lumière UV semble supprimer la formation de polymères d'ARN (Fig. 7b), l'intensité est extrêmement faible.

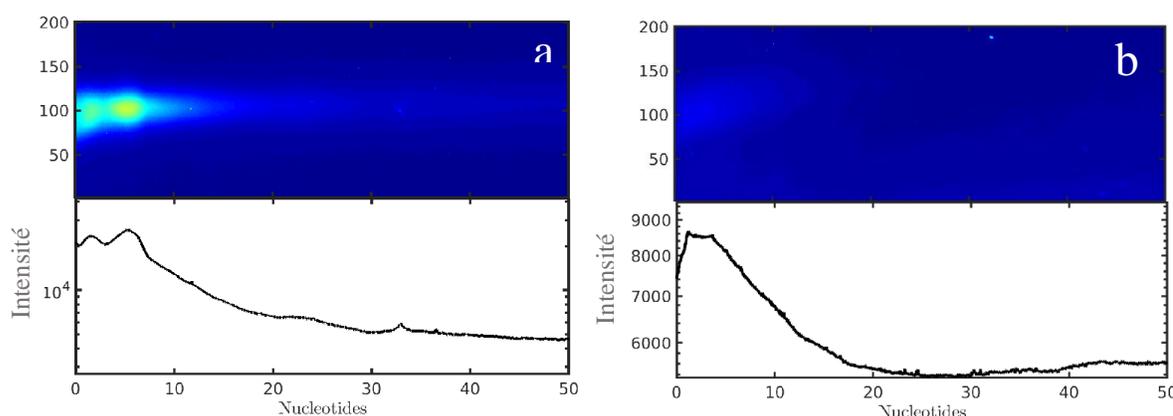


Figure 7 : Résultat du gel d'électrophorèse, analysé par le logiciel Matlab, du mélange AMP, UMP ($7.37.10^{-7}$ mol) sans (a) et avec (b) ultraviolets B et C d'intensité 2 sur 3.

Les résultats du mélange AMP / UMP avec le DMPC sont visibles sur la figure 8. Sans radiation UV (Fig. 8a), aucune polymérisation d'ARN n'est visible après 26 cycles. En présence de lumière UV

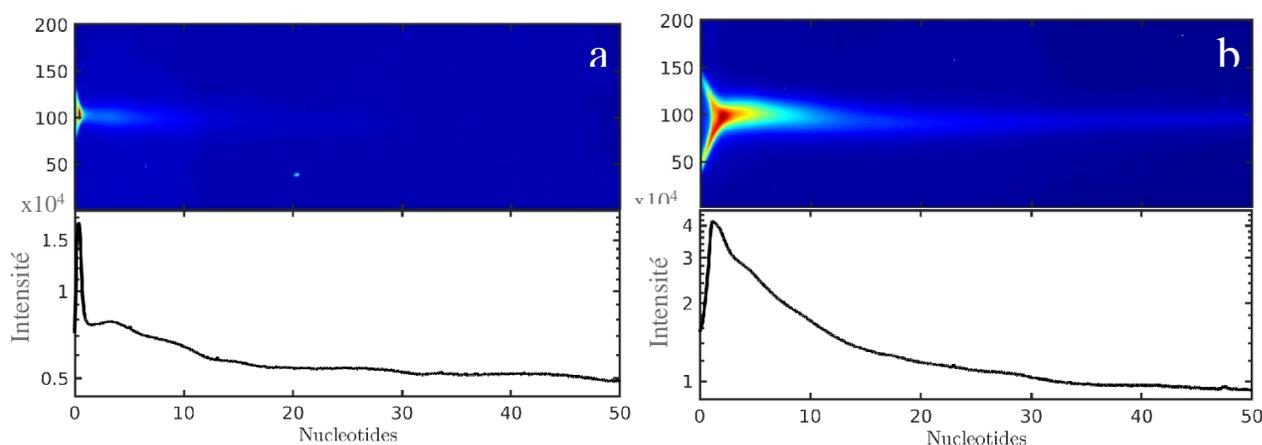


Figure 8 : Résultat du gel d'électrophorèse, analysé par le logiciel Matlab, du mélange AMP, UMP ($7.37.10^{-7}$ mol) et DMPC ($7.37.10^{-7}$ mol) sans (a) et avec (b) ultraviolets B et C d'intensité 2 sur 3.

(Fig. 8b), une forte intensité est visible atteignant 15 nucléotides. Une plus faible intensité est observée jusqu'à 25 nucléotides, indiquant un pourcentage plus faible d'ARN polymérisé à cette longueur.

Les résultats du mélange chlorure d'ammonium avec l'AMP, l'UMP et le DMPC sont montrés sur la figure 9. Sans lumière UV (Fig. 9a), comme en l'absence de sel, le mélange ne forme aucun ARN même après 25 cycles, comme les résultats précédents l'avaient montré. Les radiations UV permettent une polymérisation avec ce mélange (Fig. 9b). Effectivement, après 25 cycles, de nombreuses chaînes ont atteint une longueur de 25 nucléotides, bien qu'une plus faible intensité est observée jusqu'à 50 nucléotides.

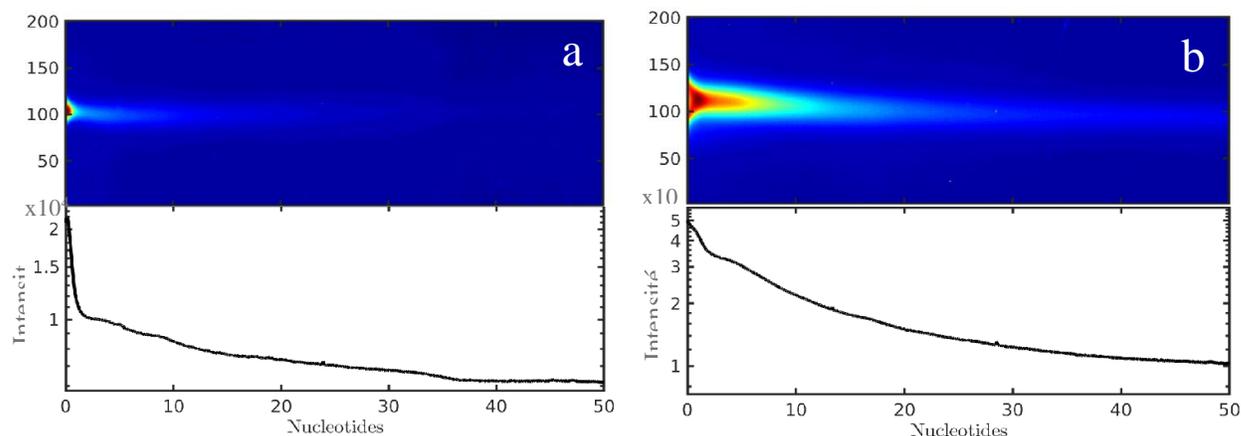


Figure 9 : Résultat du gel d'électrophorèse, analysé par le logiciel Matlab, du mélange AMP, UMP ($7.37.10^{-7}$ mol), chlorure d'ammonium ($1.47.10^{-6}$ mol) et DMPC ($7.37.10^{-7}$ mol) sans (a) et avec (b) ultraviolets B et C d'intensité 2 sur 3.

En retirant le DMPC du mélange (Fig. 10), les chaînes d'ARN formées sont plus longues avec ou sans radiations. Sans UV (Fig. 10a), l'intensité sur le gel s'étend jusqu'à 20 nucléotides. Cependant, une intensité plus légère est observée jusqu'à 50 nucléotides. Avec les lumières ultraviolettes (Fig. 10b), il est possible de voir un plateau d'une forte intensité, de l'ordre de 6.10^4 , de 0 à 9 nucléotides, puis l'intensité décroît jusqu'à 28 nucléotides. Cependant, il est possible d'observer la formation de quelques brins d'ARN atteignant 50 nucléotides, l'intensité étant plus faible.

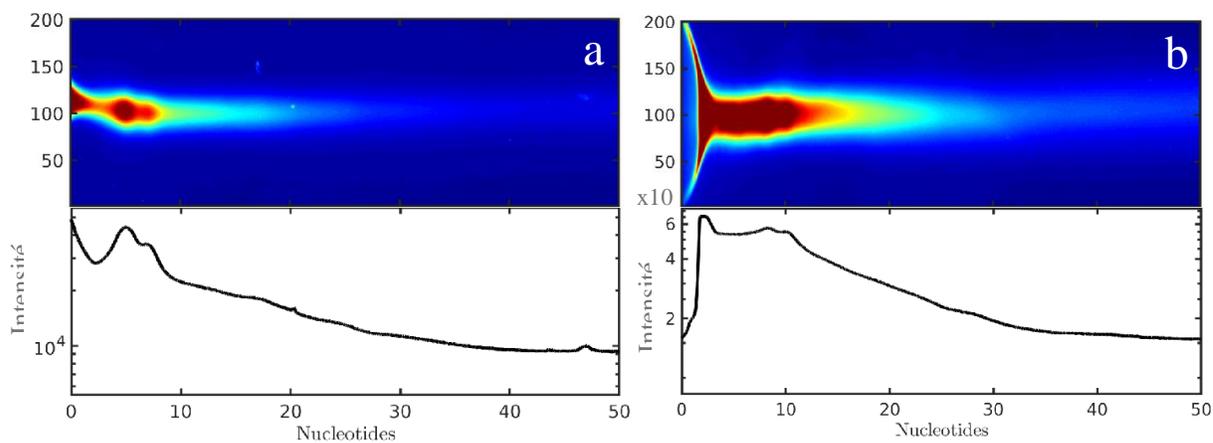


Figure 10 : Résultat du gel d'électrophorèse, analysé par le logiciel Matlab, du mélange AMP, UMP ($7.37.10^{-7}$ mol), et chlorure d'ammonium ($1.47.10^{-6}$ mol) sans (a) et avec (b) ultraviolets B et C d'intensité 2 sur 3.

3. Détermination du rapport chlorure d'ammonium / nucléotides

L'étape suivante a été de déterminer la quantité idéale des nucléotides et du chlorure d'ammonium disponibles pour pouvoir former la plus longue chaîne d'ARN possible.

Les premières expériences ont été faites avec un ratio molaire de (2:1) (chlorure d'ammonium : nucléotides). Quatre autres mélanges ont été réalisés avec différents ratios molaires : 4:1, 2:2, 4:2 et 2:3.

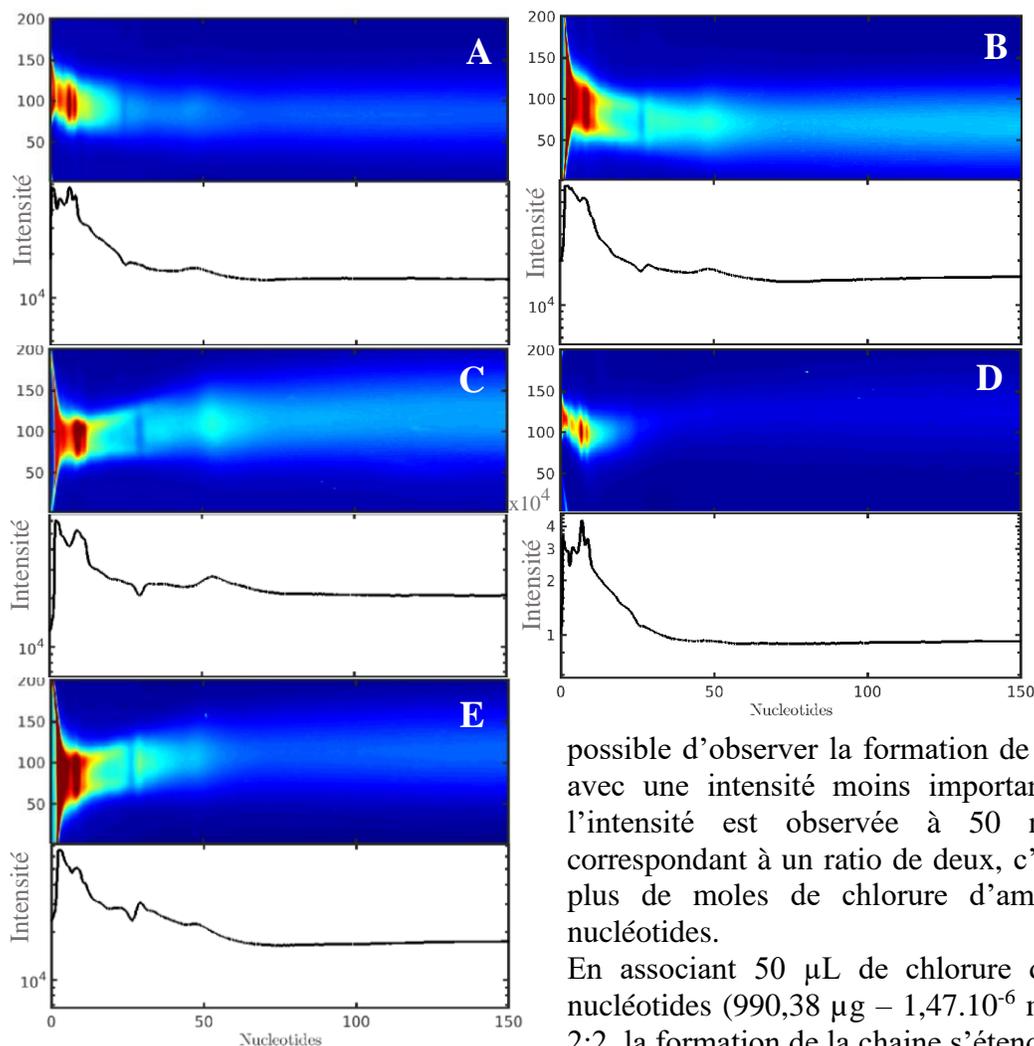


Figure 11 : Résultat du gel d'électrophorèse, analysé par le logiciel Matlab, des tests des différentes concentrations des mélanges AMP, UMP et chlorure d'ammonium ayant tournés dans le simulateur pendant 55 cycles. Rapport molaire A (2:1) ; B (2:2) ; C (4:2) ; D (4:1) ; E (2:3).

nucléotides (Fig. 11C).

La combinaison de 100 μL de chlorure d'ammonium avec 50 μL de nucléotides, correspondant à un ratio molaire de 4:1, permet de former une chaîne de 12 nucléotides (Fig. 11D). Après ce point, l'intensité décroît et passe en dessous de 1,5, ce qui pourrait être un artefact.

Les résultats (Fig. 11) montrent que la quantité de chaque élément influence la formation de l'ARN puisque tous les résultats ne sont pas égaux.

En mélangeant 50 μL de chlorure d'ammonium (78,95 μg – $1,47 \cdot 10^{-6}$ mol) avec 50 μL de nucléotides (AMP et UMP) (495,19 μg – $7,37 \cdot 10^{-7}$ mol), le ratio molaire étant 2:1 comme les expériences réalisées précédemment, les résultats obtenus sont similaires. Effectivement, les chaînes les plus longues créées sont formées de 24 nucléotides (Fig. 11A). Il est cependant

possible d'observer la formation de chaînes un peu plus longues avec une intensité moins importante puisqu'une élévation de l'intensité est observée à 50 nucléotides. Ce mélange correspondant à un ratio de deux, c'est-à-dire qu'il y a deux fois plus de moles de chlorure d'ammonium que de moles de nucléotides.

En associant 50 μL de chlorure d'ammonium et 100 μL de nucléotides (990,38 μg – $1,47 \cdot 10^{-6}$ mol), le rapport molaire étant 2:2, la formation de la chaîne s'étend jusqu'à 75 nucléotides et un pic est observé autour de 50 nucléotides (Fig. 11B).

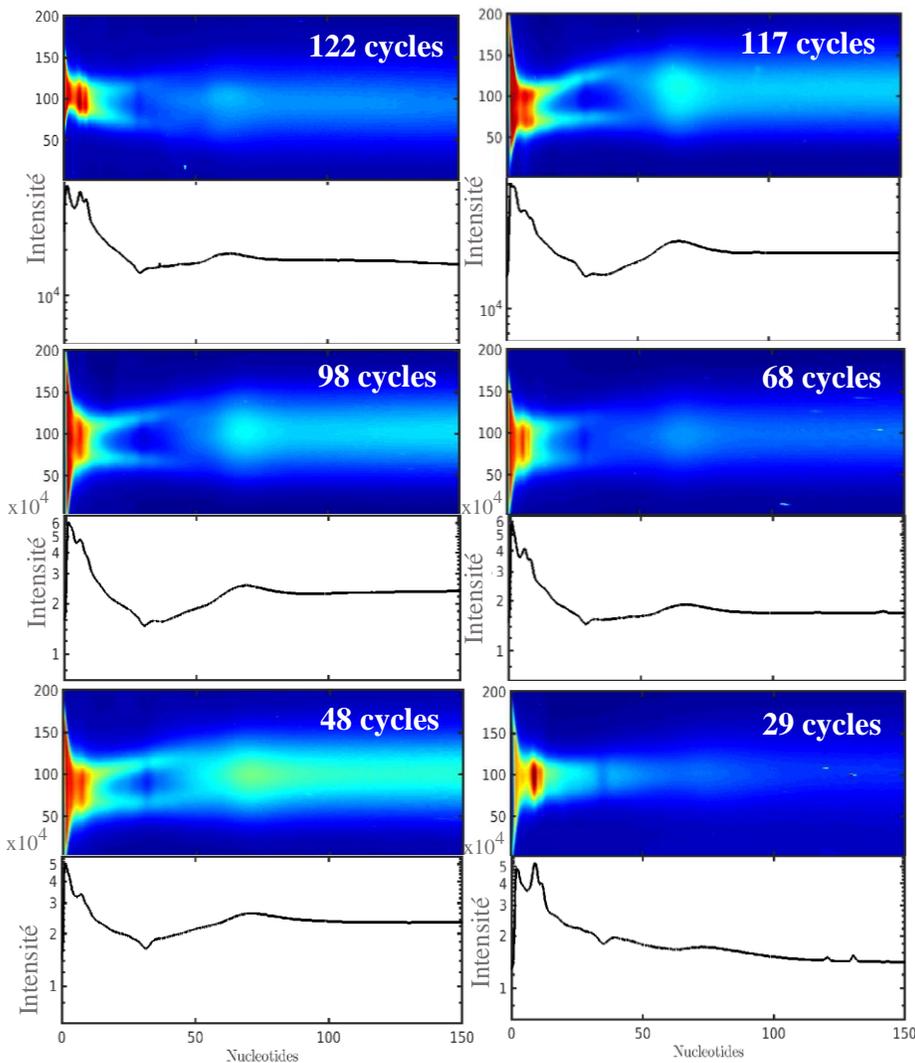
Le mélange de 100 μL de chlorure d'ammonium (157,9 μg – $2,95 \cdot 10^{-6}$ mol) et de 100 μL de nucléotides, donnant un coefficient de deux, avec un rapport molaire de 4:2, montre une élévation autour de 55 nucléotides mais l'intensité reste à $2 \cdot 10^4$ jusqu'à 150

L'incorporation de 50 μL de chlorure d'ammonium avec 150 μL de nucléotides ($1485 \mu\text{g} - 2,21 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$), le rapport nucléotidique est ici de 2:3, montre une surélévation autour de 50 nucléotides mais ce pic est moins prononcé que ceux observés sur les autres mélanges. (Fig. 11E).

Le rapport optimal, en mole, est donc de 2. Effectivement, lorsque seulement 50 μL ($7,37 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$) de nucléotides sont introduits à différentes quantités de chlorure d'ammonium, le meilleur résultat est obtenu avec ce coefficient. De la même manière, en mélangeant 100 μL de nucléotides ($1,47 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$) avec différentes quantités de chlorure d'ammonium, l'ARN le plus long réalisé est obtenu avec ce rapport de 2. L'ARN est cependant plus long avec 100 μL plutôt que 50 μL , la quantité disponible en élément étant plus grande.

Les expériences qui ont suivi ont donc été réalisées avec 100 μL de nucléotides ($1,47 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$) et 100 μL de chlorure d'ammonium ($2,95 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$).

4. Augmentation du nombre de cycles



Une fois le rapport et la quantité disponible idéale des éléments déterminés, le nombre de cycles a été augmenté. Les résultats sont montrés sur la figure 12.

Après 122 cycles, une intensité de $2 \cdot 10^4$ est observée jusqu'à 20 nucléotides, puis l'intensité décroît jusqu'à 27 nucléotides. Cependant, l'intensité augmente de nouveau et finit par former une surélévation à 60 nucléotides. Après 117 cycles, le même profil est observé. Il y a tout d'abord une forte intensité, observée jusqu'à 20 nucléotides, puis l'intensité décroît jusqu'à, ici, 35 nucléotides. Enfin, il y a une augmentation de l'intensité jusqu'à atteindre un pic à 60 nucléotides. Le même profil est observé pour les échantillons ayant tourné 98, 68 et 48 cycles. De la même manière, un pic maximal est observé autour de 60 nucléotides. Cependant, un problème est survenu au bout de 45 cycles. Effectivement, le simulateur est resté bloqué sur l'étape 3 (tableau 2), soit haute température et peu d'humidité. Ainsi, il est possible d'observer sur l'échantillon ayant tourné 48 cycles une intensité plus

Figure 12 : Résultat du gel d'électrophorèse, analysé par le logiciel Matlab, du test changement du nombre de cycles des mélanges chlorure d'ammonium ($2,95 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$) et AMP, UMP ($1,47 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$) (Ratio molaire : 4:2)

élevée que sur les autres échantillons après 60 nucléotides. L'échantillon qui n'est resté que 29 cycles a formé de plus petits ARN, de l'ordre de 42 nucléotides mais il est tout de même possible de voir se dessiner le même profil puisqu'une petite élévation est visible autour de 60 nucléotides mais l'intensité reste faible, inférieur à $2 \cdot 10^4$.

5. Blocage des cycles sur chaud / sec et froid / humide

Par la suite, deux expériences ont été réalisées basées sur les résultats obtenus lors de l'augmentation du nombre de cycles, après que le simulateur soit resté bloqué. Pour ce faire, du chlorure d'ammonium et des nucléotides ont été mélangés avec le rapport molaire 4:2. Le premier échantillon a suivi ces étapes pour la première expérience : (1) 24h soit 7 cycles classiques, (2) 24h d'étape 3 (tableau 2), (3) 24 h soit 7 cycles classiques, (4) 24h d'étape 3. Le second échantillon a subi toutes les étapes excepté la (1). Le troisième n'a tourné que pendant l'étape (3) et (4), et le dernier échantillon n'a tourné que pendant l'étape (4).

Le même processus a été suivi pour la seconde expérience, excepté que l'étape 3 a été remplacée par l'étape 2 du tableau 2. Au début de chaque nouvelle étape, une lame a été introduite dans le simulateur afin de comparer les résultats.

a. Chaud / sec

Pour cette expérience, les étapes de blocage ont permis d'avoir pendant 24 heures une haute température et une humidité relative basse, donnant les résultats obtenus sur la figure 13.

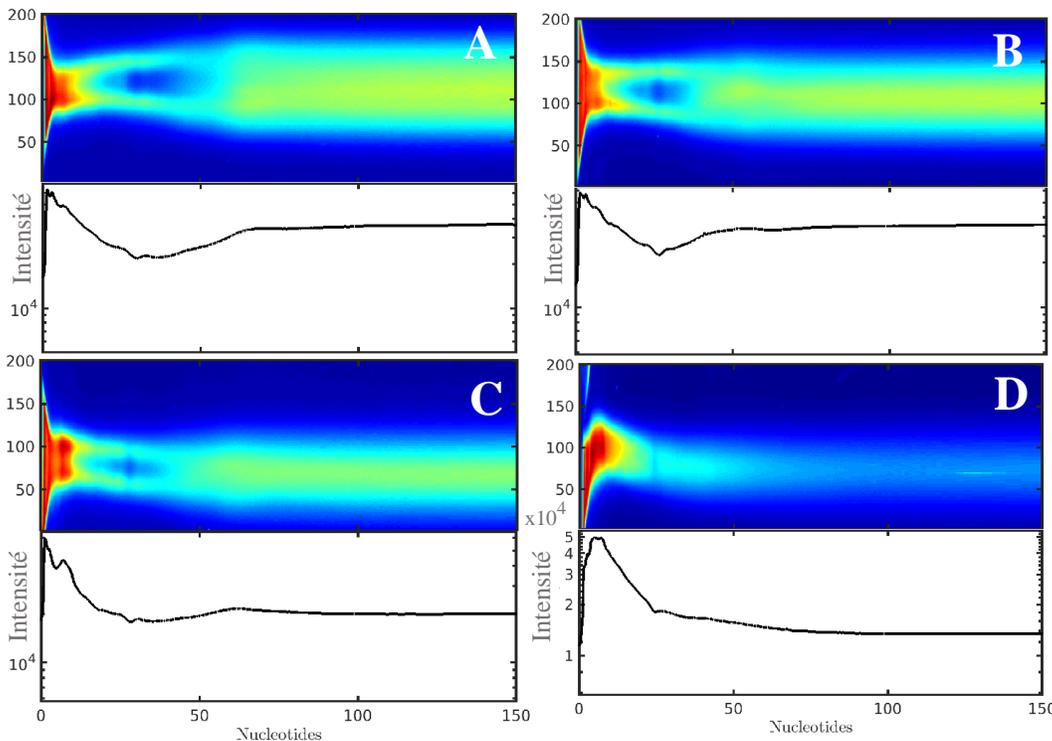


Figure 13 : Résultat du gel d'électrophorèse, analysé par le logiciel Matlab, du test blocage des étapes, chaud et sec, des mélanges chlorure d'ammonium ($2.95 \cdot 10^{-6}$ mol) et AMP, UMP ($1.47 \cdot 10^{-6}$ mol) (Ratio molaire : 4:2). Etapes suivit par les échantillons : A : (1)(2)(3)(4) / B : (2)(3)(4) / C : (3)(4) / D : (4).

L'échantillon A, ayant subi toutes les étapes, montre une forte intensité sur le gel, de l'ordre de $3,6 \cdot 10^4$, jusqu'à au moins 150 nucléotides. Il est possible d'observer un trou d'intensité sur le gel et sur le graphique, ce qui veut dire qu'aucun ARN n'a été formé de nucléotides entre 20 et 55 nucléotides. L'échantillon B, qui a 24h de cycles classiques en moins, a permis de former le même nombre d'ARN d'au moins 150 nucléotides que l'échantillon A, puisque ces deux échantillons ont la même intensité.

Cependant, le trou observé n'est pas à la même position. Effectivement, aucun ARN n'a été formé entre 10 et 45 nucléotides cette fois-ci. L'échantillon C, qui a tourné avec 24h de cycles classiques et 24h bloquée sur une haute température et une basse humidité, a le même profil que les deux échantillons précédents mais l'intensité est de $2 \cdot 10^4$. De nombreux ARN ont été formés d'au moins 150 nucléotides mais aucun n'a une longueur comprise entre 10 et 40 nucléotides, puisqu'un trou est observé sur le gel et le graphique. Le dernier échantillon, qui n'a subi qu'une étape bloquée sur haute température et basse humidité, n'a pas le même profil que les autres échantillons. Effectivement, les ARN formés ont une longueur maximale de 40 nucléotides.

b. Froid / humide

Pour cette expérience, les étapes de blocages ont été inversées, il y avait alors dans la chambre du simulateur une basse température et une haute humidité. Les résultats sont montrés sur la figure 14.

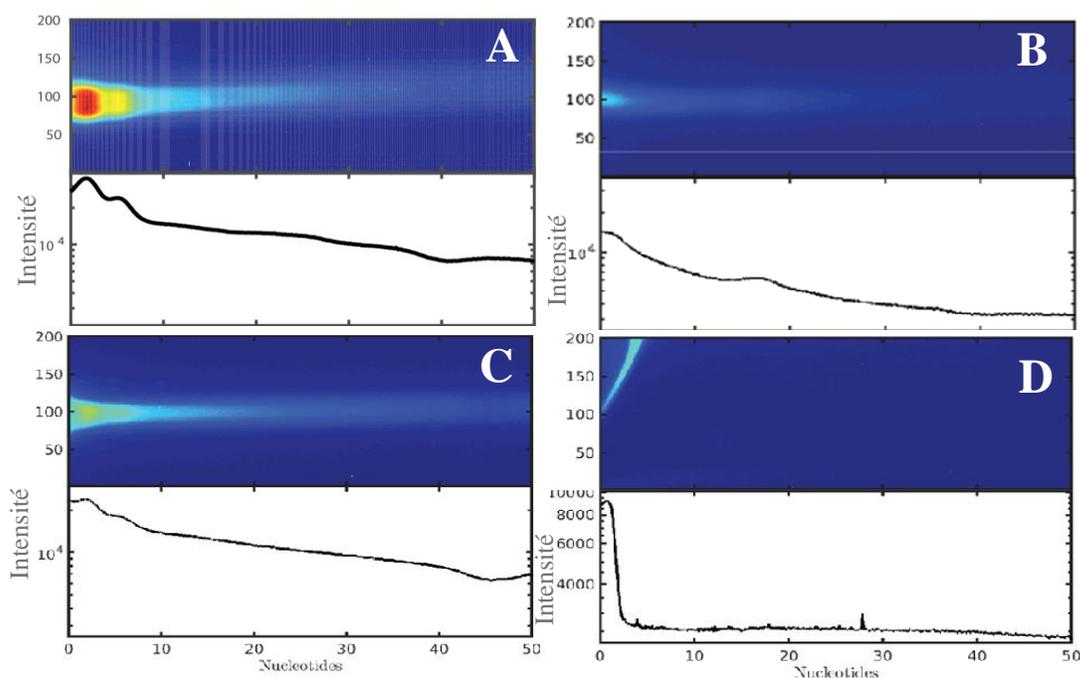


Figure 14 : Résultat du gel d'électrophorèse, analysé par le logiciel Matlab, du test blocage des étapes, froid et humide, des mélanges chlorure d'ammonium ($2.95 \cdot 10^{-6}$ mol) et AMP, UMP ($1.47 \cdot 10^{-6}$ mol) (Ratio molaire : 4:2). Étapes suivit par les échantillons : A : (1)(2)(3)(4) / B : (2)(3)(4) / C : (3)(4) / D : (4).

Le premier échantillon qui a subi toutes les étapes, a permis de former des ARN de 10 nucléotides au maximum. Beaucoup de courts ARN ont été formés, de l'ordre de 4 et 6 nucléotides. Aucun ARN n'a été formé avec l'échantillon B, qui a 24h de cycles en moins. L'échantillon C, qui n'a subi qu'une étape de cycle et une étape de blocage n'a formé que des ARN de 10 nucléotides au maximum. Le même profil est observé ici et sur l'échantillon A, avec

une intensité légèrement plus faible, puisque de courts ARN de 4 et 6 nucléotides ont été formés. Le dernier échantillon comme l'échantillon 3, aucun ARN n'a été formé. Donc, avec les échantillons B et D, aucun ARN n'est présent et ces échantillons ont été introduits juste avant les étapes de blocage.

IV. DISCUSSION

Afin de déterminer si un élément permet d'accélérer le processus de polymérisation des nucléotides, différentes substances ont été sélectionnées. Tout d'abord, plusieurs sels ont été choisis : chlorure d'ammonium, chlorure de magnésium, chlorure de calcium, chlorure de sodium, hydroxyde de potassium et sulfate de potassium. Des études antérieures ont montré que le chlorure d'ammonium favorise la synthèse de l'ARN (Da Silva *et al.*, 2014), tandis que le magnésium, le calcium et le potassium jouent des rôles clés dans le métabolisme cellulaire moderne. Les ions magnésium interagissent notamment avec les composés phosphates comme l'ARN (mais aussi l'ADN et l'Adénosine triphosphate (ATP)) (Misra et Draper., 1998). Le DMPC et le DPPC ont été choisis car ces molécules lipidiques ont une structure simple et une chaîne carbonée de longueur différente. L'argile montmorillonite a été sélectionnée car celle-ci est riche en silicates zéolites et en feldspaths (aluminosilicates de potassium, sodium ou calcium). Cette caractéristique pourrait être responsable de la répllication de biopolymères grâce à la présence de sites acides et/ou d'espèces hydroxylées localisées dans des cavités de taille moléculaire (Pérez-Villa *et al.*, 2018). L'argile montmorillonite serait un catalyseur au niveau des acides nucléiques car sa charge anionique et son pH peuvent permettre la catalyse d'une réaction d'activation des acides nucléiques qui entraînerait la formation d'ARN (Hernot, 2016).

Les nucléotides ne polymérisent pas correctement sans un catalyseur mais celui-ci doit être bien choisi. Sur les 22 mélanges réalisés, deux mélanges ont permis de former une chaîne plus longue que 10 nucléotides : le mélange nucléotides / chlorure d'ammonium et le mélange nucléotides / chlorure d'ammonium / chlorure de sodium / chlorure de magnésium / sulfate de potassium. Cependant, aucun des sels, excepté le chlorure d'ammonium, n'a donné de résultats probants. Il est donc possible de dire que dans ce mélange, seul le chlorure d'ammonium a aidé à la polymérisation d'ARN. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Da Silva *et al.* (2015). Le chlorure d'ammonium, également connu sous le nom de sel ammoniac, très soluble dans l'eau, se trouve naturellement dans les régions volcaniques et près des fissures présentes dans la croûte terrestre. Il apparaît sous forme de plaque ou de croûte (MEL Science, n.d.). Ce sel devient donc un candidat très intéressant pour la catalyse de l'ARN puisque sur la Terre primitive, de nombreux volcans étaient présents (Martin, 2008). Étant très soluble dans l'eau, ce seraient les ions formés ($\text{NH}_4\text{Cl} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{Cl}^-$ / $\text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_3\text{O}^+$) qui permettraient la catalyse de l'ARN. Un des produits de la réaction de dissolution, l'ion ammonium (NH_4^+), pourrait aider la polymérisation en interagissant et en ordonnant les nucléotides pendant la phase de déshydratation et de cristallisation (Da Silva *et al.*, 2014).

Plusieurs paramètres ont été modifiés et optimisés afin de comprendre comment la synthèse d'ARN a pu être possible dans des conditions prébiotiques, sans l'existence de la machinerie cellulaire présente aujourd'hui sur Terre. En outre, la variation de certains paramètres a permis de comprendre davantage les régimes environnementaux qui auraient pu être présents au début de la vie.

L'un des premiers paramètres à avoir été modifié a été le type de radiation. En effet, la Terre primitive n'était pas protégée par la couche d'ozone qui s'est formée après 2,32 Milliards d'années (Lethiers, 1998). Des recherches ont montré que l'action des ultraviolets auraient pu permettre l'apparition de bases azotées dans des mares chaudes (Sacco, 2014). Mais il est aussi connu que les UV détruisent les chaînes nucléotidiques dans notre corps (Coumoul, 2016) et effectivement, d'après

les résultats, le mélange de nucléotides sous ultraviolets ne forme aucun ARN contrairement à l'exposition des nucléotides sous lumière visible.

Des études ont montré que les lipides peuvent avoir un rôle dans la polymérisation de l'ARN en formant des phases lipidiques multilamellaires et en emprisonnant ainsi les chaînes polynucléotidiques préalablement formées (Rajamani *et al.*, 2007). Les images du mélange nucléotides / lipides sans UV prises au microscope optique montrent effectivement des vésicules pouvant être utilisées comme protocellules dans un environnement prébiotique. Cependant, d'après les résultats obtenus, la polymérisation dans un milieu lipidique ne se fait qu'en présence d'UV alors que sous lumière visible, celle-ci ne se fait pas. De la même manière, en additionnant du chlorure d'ammonium au mélange lipides / nucléotides, la polymérisation ne se fait qu'en présence d'ultraviolets. D'après ces résultats, les lipides aident à la polymérisation d'ARN mais seulement lorsque le mélange est soumis aux rayons ultraviolets. Mais les recherches de Mungi et Rajamani (2015) ont montré que le rapport lipides / nucléotides serait très important pour la polymérisation d'ARN.

Même sans lipide, les ultraviolets permettent une polymérisation plus importante des nucléotides en présence de chlorure d'ammonium. Effectivement, les rayons permettent d'augmenter la longueur des chaînes nucléotidiques mais aussi la rapidité de formation, puisque pour le même nombre de cycles, l'intensité, pour les brins courts, passe de $4 \cdot 10^4$ sans UV à $6 \cdot 10^4$ avec UV. Les ultraviolets jouent aussi un rôle dans la structure des échantillons. Sans ultraviolets, il est possible d'observer au microscope des cristaux entourés de nucléotides. La présence des UV semble inhiber la formation de ces cristaux. Les UVB et C utilisés dans ces expériences sont très énergétiques mais sont aujourd'hui arrêtés par la couche d'ozone (Futura rédaction, n.d). Ces rayonnements auraient pu permettre d'apporter suffisamment d'énergie pour aider à la formation des chaînes polypeptidiques et non pas de les détruire, en plus de l'énergie fournie par la chaleur élevée.

D'autres conditions sont nécessaires pour la formation de chaînes polypeptidiques tel que l'ARN. D'après les résultats, il est nécessaire d'avoir un rapport molaire optimal. Le ratio pour le chlorure d'ammonium et les nucléotides est de deux. Si le ratio est en dessous ou au-dessus, les chaînes nucléotidiques formées sont plus courtes. Effectivement, une quantité trop importante de nucléotides par rapport au chlorure d'ammonium ne permet pas une mise en contact de tous les nucléotides avec le sel. A l'inverse trop de sel éloigne les nucléotides les uns des autres empêchant la formation des ponts phosphodiester. En plus de ce rapport à prendre en compte, il est nécessaire d'avoir une quantité disponible en élément suffisante pour pouvoir augmenter la longueur de la chaîne.

Un autre élément intéressant a été de constater que le nombre de cycles n'est pas proportionnel à la longueur du polymère d'ARN formé. Effectivement, que les échantillons aient tourné 122 cycles ou 48 cycles dans le simulateur, le même profil a été observé sur les gels d'électrophorèse et sur les graphiques. Tout d'abord, de courts peptides sont formés d'une dizaine de nucléotides puis l'intensité décroît et croît à nouveau pour finir par une élévation d'intensité autour de 60 nucléotides. Cela signifie que la durée de polymérisation n'a pas d'importance mais celle-ci cesse de se faire après que le polypeptide a atteint une longueur de 60 nucléotides.

Le dernier paramètre à avoir été modifié a été les cycles eux-mêmes. En alternant les cycles sec-humide / chaud-froid avec un blocage sec et chaud sur la même durée que les cycles, des chaînes polypeptidiques d'une longueur d'au moins 150 nucléotides ont été formées. Lors des phases chaudes et sèches, les nucléotides ont assez d'énergie pour se lier, alors que le manque d'eau minimise

l'hydrolyse et restreint le mouvement des nucléotides de sorte que les nucléotides qui se sont retrouvés alignés pendant la phase de séchage puissent se lier. Cependant, il a été remarqué que lorsque les échantillons placés dans le simulateur sans subir de cycles, mais juste 24 heures à haute température et basse humidité, formaient peu d'ARN. Donc, il est nécessaire d'avoir à la fois les cycles sec-humide / chaud-froid et un blocage chaud-sec pour augmenter la synthèse peptidique.

A l'inverse, l'alternance cycles et blocage froid-humide inhibe la formation de polymère. Les seuls polymères visibles sur le gel ont été formés lors des phases cycliques et non bloquées.

V. CONCLUSION

Ces résultats montrent que le processus évolutif de notre matériel génétique a dû être un ajustement minutieux, caractérisé par des paramètres prébiotiques importants (Figure 15). Avant la formation des ARN modernes, les cycles ont dû jouer un rôle primordial dans des environnements types étangs chauds, alternés par des années chaudes et sèches. Ces années fourniraient plus d'énergie pour lier les nucléotides entre eux et le manque d'eau éviterait le mouvement de ceux-ci. La proximité volcanique ou de fissures dans la croûte terrestre auraient pu permettre l'accumulation de chlorure d'ammonium pour catalyser la polymérisation des pré-ARN en plus du bombardement des rayons ultraviolets aidant à leur synthèse. Pour une polymérisation optimale, le rapport nucléotides / chlorure d'ammonium devait être de deux.

De nombreuses pistes restent cependant à étudier tels que la formation des protocellules mais aussi le processus d'autoréplication de l'ARN qui s'est produit dans des conditions prébiotiques.

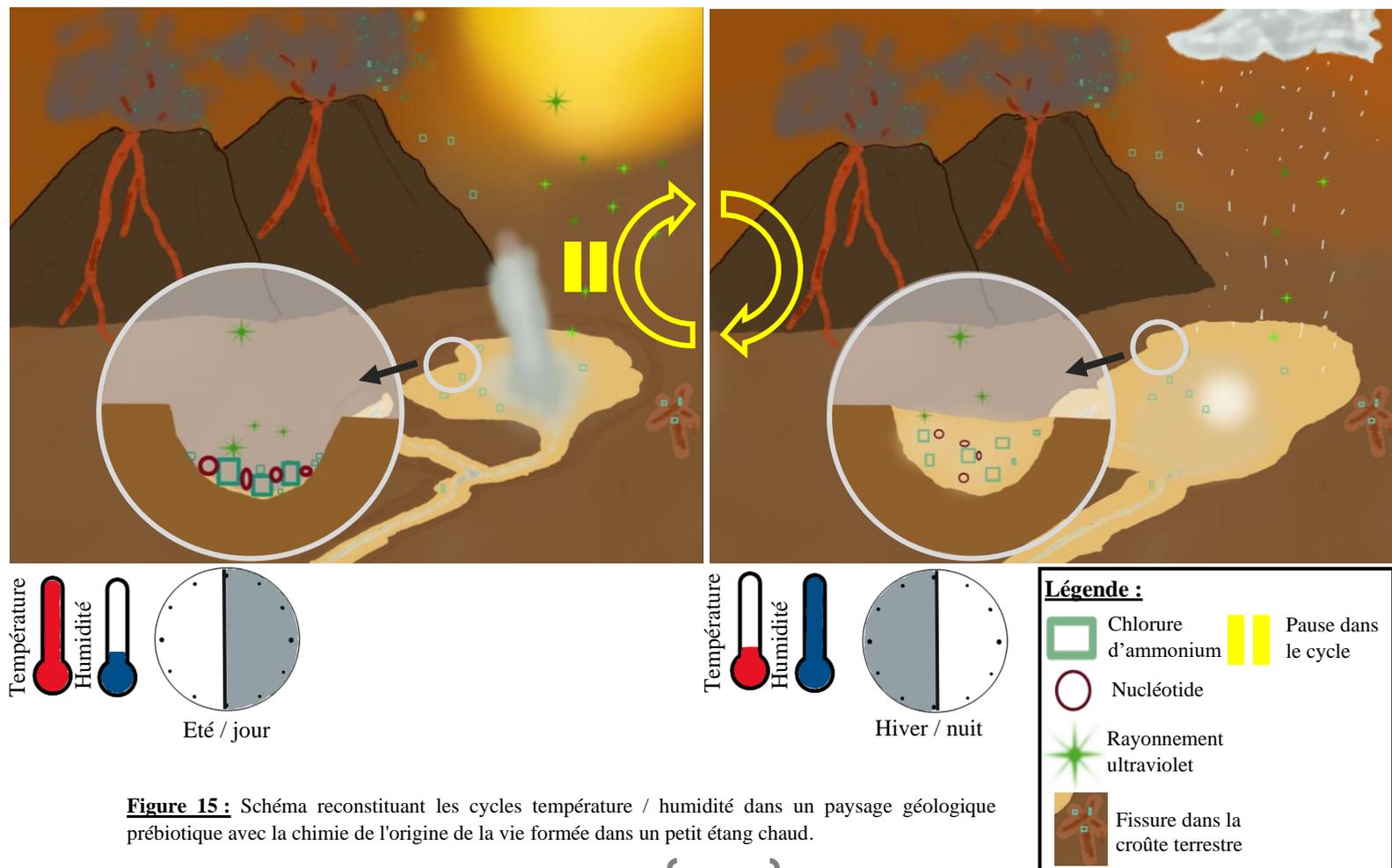


Figure 15 : Schéma reconstituant les cycles température / humidité dans un paysage géologique prébiotique avec la chimie de l'origine de la vie formée dans un petit étang chaud.

BIBLIOGRAPHIE

- Altman, S., Baer, M., Guerrier-Takada, C. and Vioque, A., 1986. Enzymatic cleavage of RNA by RNA. *Trends in Biochemical Sciences*, 11(12), pp.515-518.
- Cech, T. and Bass, B., 1986. Biological Catalysis by RNA. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), pp.599-629.
- Coumoul, X., Dardel, F. and Blanc, E., 2016. *Mémo Visuel De Biochimie*. Paris: Dunod, pp.124-125 et 178-179.
- Damer, B., 2016. A Field Trip to the Archaean in Search of Darwin's Warm Little Pond. *Life*, 6(2), p.21.
- Damer, B. and Deamer, D., 2015. Coupled Phases and Combinatorial Selection in Fluctuating Hydrothermal Pools: A Scenario to Guide Experimental Approaches to the Origin of Cellular Life. *Life*, 5(1), pp.872-887.
- Da Silva, L., Maurel, M. and Deamer, D., 2014. Salt-Promoted Synthesis of RNA-like Molecules in Simulated Hydrothermal Conditions. *Journal of Molecular Evolution*, 80(2), pp.86-97.
- Deamer, D., 2012. *First Life*. Berkeley, Calif.: University of California Press, pp.29-31.
- Erastova, V., Degiacomi, M., G. Fraser, D. and Greenwell, H., 2017. Mineral surface chemistry control for origin of prebiotic peptides. *Nature Communications*, 8(1)
- Futura rédaction, n.d. *Ultraviolet*. [en ligne] Futura-Sciences. Disponible sur : <<https://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/physique-ultraviolet-1003/>> [Accès le 9 juin 2020].
- Gilbert, W., 1986. Origin of life: The RNA world. *Nature*, 319(6055), pp.618-618.
- Hernot, F., 2016. L'argile, son utilisation à l'officine. Thèse pour Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, sous la direction de Anne-Marie Le Ray, Angers, Unités de Formation et de Recherche.
- Javaux, E., 2019. Challenges in evidencing the earliest traces of life. *Nature*, 572(7770), pp.451-460.
- Jimmy G., 2018. *Li Lab SOP Manual*, Li Lab, McMaster University.
- Lethiers, F., 1998. *Evolution De La Biosphere Et Evenements Geologiques*. Amsterdam: Gordon and Breach Science, p.321.
- Martin, H., 2008. *L'environnement De La Terre Primitive : L'archéen Et L'hadéen | Société Française D'exobiologie - French Astrobiology Society*. [en ligne] Exobiologie.fr. Disponible sur : <<http://www.exobiologie.fr/blog/2008/09/24/lenvironnement-de-la-terre-primitive-larcheen-et-lhadéen/>> [Accès le 11 juin 2020].
- MEL Science. n.d. *Chlorure D'ammonium - MEL Chemistry*. [en ligne] Disponible sur : <<https://melscience.com/BE-fr/reagents/26/>> [Accès le 9 juin 2020].
- Misra, V. and Draper, D., 1998. On the role of magnesium ions in RNA stability. *Biopolymers*, 48(2-3), pp.113-135.
- Mungi, C. and Rajamani, S., 2015. Characterization of RNA-Like Oligomers from Lipid-Assisted Nonenzymatic Synthesis: Implications for Origin of Informational Molecules on Early Earth. *Life*, 5(1), pp.65-84.
- Pearce, B., Pudritz, R., Semenov, D. and Henning, T., 2017. Origin of the RNA world: The fate of nucleobases in warm little ponds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(43), pp.11327-11332.
- Pérez-Villa, A., Pietrucci, F. and Saitta, A., 2018. Prebiotic chemistry and origins of life research with atomistic computer simulations. *Physics of Life Reviews*.
- Rajamani, S., Vlassov, A., Benner, S., Coombs, A., Olasagasti, F. and Deamer, D., 2007. Lipid-assisted Synthesis of RNA-like Polymers from Mononucleotides. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 38(1), pp.57-74.
- Sacco, L., 2014. *Origine De La Vie : Une Nouvelle Voie Pour L'Apparition De L'ARN ?*. [en ligne] Futura-Sciences. Disponible sur : <<https://www.futura-sciences.com/sciences/actualites/chimie-origine-vie-nouvelle-voie-apparition-arn-51275/>> [Accès le 9 juin 2020].
- Topozini, L., Dies, H., Deamer, D. and Rheinstädter, M., 2013. Adenosine Monophosphate Forms Ordered Arrays in Multilamellar Lipid Matrices: Insights into Assembly of Nucleic Acid for Primitive Life. *PLoS ONE*, 8(5), p.e62810.

