



HAL
open science

Synthèse prébiotique de Ribonucléotides sur des surfaces minérales

Mariame Akouche

► **To cite this version:**

Mariame Akouche. Synthèse prébiotique de Ribonucléotides sur des surfaces minérales. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066609 . tel-01547822

HAL Id: tel-01547822

<https://theses.hal.science/tel-01547822v1>

Submitted on 27 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale (397)

Laboratoire de Réactivité de Surface

Synthèse prébiotique de Ribonucléotides sur des surfaces minérales

Par Mariame AKOUCHE

Thèse de doctorat de Physique et Chimie des Matériaux

Dirigée par Jean-François LAMBERT et Marie-Christine MAUREL

Soutenance prévue le 14 décembre 2016

Devant un jury composé de :

M. Jean-François Lambert	Professeur des Universités	UPMC	Directeur de thèse
Mme. Marie-Christine Maurel	Professeur des Universités	UPMC	Co-directrice de Thèse
M. Thomas Georgelin	Maitre de conférences	UPMC	Encadrant
Mme. Maguy Jaber	Professeur des Universités	UPMC	Encadrante-Membre invitée
Mme. Svetlana Mintova	Directrice de Recherche	Caen	Rapporteur
M. Terence Kee	Professeur associé	Leeds	Rapporteur
M. Jean-Luc Decout	Professeur des Universités	Grenoble	Examineur
M. Luc Delmotte	Ingénieur de Recherche	Mulhouse	Examineur
M. Franck Launay	Professeur des Universités	UPMC	Examineur



Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Jean-François Lambert et Marie-Christine Maurel de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet qui était tout à fait nouveau pour moi.

Jean François, je te remercie chaleureusement pour l'ensemble de ces trois années. Je te remercie de m'avoir fait découvrir le monde prébiotique, l'exobiologie. Tout au long du travail, tu étais très patient, tu m'as beaucoup donné de confiance, tu as su orienter mes recherches dans le bon sens tout en me laissant une grande liberté dans les directions que je souhaitais, tu m'as toujours encouragé et entendu surtout dans les périodes de stress. Tu m'as appris qu'un bon chercheur est toujours en stade d'apprentissage quel que soit son niveau scientifique. En plus, ta précision dans le travail m'a rendu plus attentive dans mes choix, dans mon plan de travail et dans les interprétations des résultats. Surtout, il ne faut pas oublier ta culture scientifique qui a enrichi mon cursus. Encore une fois, merci beaucoup pour ces trois agréables années de thèse. Je n'oublie jamais tes deux expressions : *Mariame, il faut à un certain moment arrêter de faire des décompositions. Il faut toujours écrire tout ce qu'on pense, quand on écrit on n'oublie pas et on sera obligé à réfléchir et à mieux comprendre les résultats !!*

Marie-Christine, je te remercie pour ton encouragement tout au long du travail, pour ta motivation que tu m'as toujours transmise et pour tes précieux conseils. Tu m'as toujours dit : Ton sujet de thèse est très intéressant. C'est le moment pour te remercier de m'avoir donné cette chance.

Je tiens à remercier Mme Svetlana Mintova et M. Terence Kee d'avoir accepté de rapporter ce travail et de faire partie du jury. Je voudrais également

remercier M. Luc Demotte, M. Jean-Luc Decout et M. Franck Launay pour avoir accepté d'examiner mes travaux.

Maguy Jaber, ma co-encadrante souriante qui a un très grand cœur, qui a toujours le temps de m'entendre, de m'aider, de trouver des solutions le plus rapidement possible. Tu as toute ma gratitude pour m'avoir donné ta confiance dès le début de la thèse. Je suis très reconnaissante pour ton aide et ton encouragement qui ont permis de mener un travail pluridisciplinaire riche et passionnant. Vraiment je ne trouve pas les expressions convenables mais brièvement en une phrase je peux dire " *tu es mon idole sur tous les niveaux, scientifique et social*".

Ce projet n'aurait pas pu avoir lieu sans un encadrement parfait de la part de Thomas Georgelin. En effet, je suis très contente d'être ta première thésarde et j'espère avoir laissé une bonne impression pour ta première expérience. Tout au long de ma thèse, tu m'as beaucoup encouragé et tu as fait confiance à mon travail. Egalement, tu m'as toujours incité à participer à des formations et des conférences. Tu étais fier de mon travail, tu m'as présenté à la société d'exobiologie et à tes collaborateurs en plusieurs occasions. Je te remercie pour tous tes efforts durant ces trois années. Aussi, je te remercie de m'inclure dans deux sujets de ton projet de recherche. Je n'oublierai jamais ta phrase : « *je veux que tu sois la meilleur et je sais que tu peux le faire* ».

Je remercie également l'ensemble des personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler durant ces trois ans et plus particulièrement Thomas Onfroy, Yannick Millot, Jean-Marc Kraft, Baptiste et Frédéric Fournier. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'ensemble des équipes du LRS et du LAMS.

Je remercie particulièrement mes chers amis Marie-Nour Kaydouh, Achraf Blout et Olfa ben Moussa, je vous aime énormément et vous allez me manquer. Je n'oublierai jamais nos souvenirs, nos pauses-café, nos sorties et nos

enrichissantes discussions !!! Vous étiez ma famille en France. Je vous souhaite un bon avenir.

Je remercie la région Ile de France pour son support financier dans le cadre du programme DIM-ACAV.

Je terminerai ces remerciements par une grande pensée à ma famille, sans elle sans son soutien je n'aurais pas pu être là aujourd'hui. Un grand merci à mes parents, mes frères, ma sœur mes nièces et mes neveux pour leur amour et leur encouragement tout au long de mes études.

Je tiens aussi à remercier tous ceux qui ont, de près ou de loin, aidé à rendre ce travail possible, que ce soit par des idées ou par des encouragements.

Merci à tous !

Table des matières

I. Introduction.....	1
II. Chapitre I : Etat de l'Art.....	6
A. Exobiologie et Terre primitive.....	6
I. Introduction à l'exobiologie.....	6
II. Terre primitive.....	7
III. Théories sur l'apparition de la vie sur Terre.....	11
IV. Les témoins de la naissance de la vie sur Terre.....	14
B. Acides nucléiques et nucléotides.....	17
I. Découverte.....	17
II. Structure.....	18
III. Acide ribonucléiques.....	19
IV. Les nucléotides.....	23
C. Le ribose.....	35
I. Structure.....	35
II. Formation et stabilité.....	36
III. Techniques de caractérisation.....	40
D. Les bases nucléiques.....	45
I. Structure.....	45
II. Formation et stabilité.....	45
III. Techniques de caractérisation.....	50
E. Les phosphates.....	51
I. Les différentes sources de phosphates sur la Terre primordiale.....	51
II. Les polyphosphates : source et paramètre thermodynamique de formation.....	53
III. Techniques de caractérisation.....	55
F. Surfaces minérales.....	60
I. Apports par rapport au travail en solution.....	60
II. La silice amorphe.....	61
III. Les argiles.....	68
III. Chapitre II : Matériels et méthodes.....	85
A. Préparation des échantillons.....	85
I. Les supports utilisés.....	85
II. Les produits chimiques utilisés.....	85
III. Adsorption et traitement des échantillons.....	86
B. Analyse thermogravimétrique.....	91
I. Principe.....	91
II. Type d'information.....	91
III. Inconvénients de cette méthode.....	92
IV. Appareillage et conditions opératoires.....	92
C. Diffraction des Rayons X.....	92
I. Principe.....	92
II. Type d'information.....	93
III. Appareillage et conditions opératoires.....	93
D. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	94

I.	Principe.....	94
II.	Type d'information.....	98
III.	Appareillage et conditions opératoires.....	98
E.	Spectroscopie MALDI.....	99
I.	Principe.....	99
II.	Mécanismes physico-chimiques conduisant à la production d'ions.....	100
III.	Spectromètre MALDI-TOF : appareillage et conditions opératoires.....	101
F.	Analyse infrarouge FTIR.....	102
I.	Principe.....	102
II.	Type d'information.....	103
III.	Appareillage et conditions opératoires.....	103
IV.	Inconvénients.....	104
IV.	Chapitre III : Matériels et méthodes : Réactivité thermique du D-ribose sur la silice.....	105
A.	Introduction.....	105
B.	Article.....	106
C.	Conclusion.....	153
V.	Chapitre IV : phosphorylation et glycosilation du ribose sur la silice.....	155
A.	Adsorption de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{SiO}_2$	155
I.	Diffraction des rayons X (DRX).....	155
II.	Analyse thermogravimétrique (ATG).....	156
III.	RMN ^{31}P	158
IV.	Discussion générale sur les systèmes Pi/SiO_2	164
B.	Phosphorylation du ribose sur la surface de la silice.....	168
I.	Adsorption simultanée du ribose et KH_2PO_4	168
II.	Adsorption successive de KH_2PO_4 et de ribose.....	182
III.	Discussion : phosphorylation du ribose.....	187
IV.	Conclusions.....	194
C.	Réaction du ribose avec l'adénine sur la surface de la silice.....	196
I.	En absence de phosphate inorganique.....	196
II.	En présence de phosphate inorganique.....	200
D.	Condensation AMP-UMP.....	219
I.	Analyse FTIR.....	219
II.	RMN de ^{31}P (1 pulse).....	220
III.	Analyse MALDI.....	222
IV.	Conclusions.....	225
VI.	Chapitre V : Formation d'AMP sur la saponite.....	228
A.	Introduction.....	228
B.	Adsorption du KH_2PO_4	228
I.	Analyse de diffraction rayons X (DRX).....	228
II.	Analyse thermogravimétrique (ATG).....	229
III.	RMN ^{31}P (1 pulse).....	230
C.	Adsorption du D-ribose.....	232
I.	Diffraction des rayons X (DRX).....	232

II.	Analyse infrarouge (FTIR).....	233
III.	Analyse ¹³ C CP MAS RMN.....	233
D.	Co-adsorption de D-Ribose et du KH ₂ PO ₄	234
I.	Analyse thermogravimétrique (ATG).....	234
II.	Diffraction des rayons X (DRX).....	235
III.	Analyse infrarouge (FTIR).....	236
IV.	Analyse ³¹ P RMN (1 pulse).....	237
E.	Co-adsorption de D-ribose, KH ₂ PO ₄ et adénine.....	238
I.	Diffraction des rayons X (DRX).....	238
II.	Analyse infrarouge (FTIR).....	239
III.	Analyse ³¹ P RMN (1 pulse).....	241
IV.	Analyse MALDI.....	243
F.	Discussion générale.....	244
VII.	Discussion générale.....	246
VIII.	Perspectives.....	253

Introduction

I. Introduction

La question des origines de la vie est l'une des plus grandes énigmes scientifiques. Depuis l'antiquité, elle est un objet de spéculations. Depuis le vingtième siècle, elle est aussi un objet d'études scientifiques empiriques. La progression des découvertes scientifiques a permis d'apporter quelques réponses au fil du temps, mais le manque de résultats expérimentaux et la disparition quasi complète des fossiles ont rendu difficile la réponse à toutes ces questions. L'exobiologie tente d'y répondre. C'est une science interdisciplinaire s'intéressant à l'étude de l'origine, de l'évolution et de l'expansion de la vie dans l'univers. Or jusqu'à présent, le seul exemple de vie dont nous disposons est celui de la vie sur Terre, et c'est bien de la vie sur Terre qu'il faut partir.

La recherche des origines moléculaires de la vie doit être une entreprise interdisciplinaire impliquant des chimistes, des physiciens, des modélisateurs aussi bien que des spécialistes des sciences du vivant. L'originalité du vivant nécessite en effet, si l'on veut en découvrir l'origine, la compréhension de toutes les étapes physico-chimiques et biologiques depuis les origines ce qui exige la prise en compte du processus historique de l'évolution prébiotique. Et c'est bien là que réside l'une des principales difficultés.

Les scientifiques ont essayé de synthétiser au laboratoire les molécules fondamentales de la biologie contemporaine (sucres, acides nucléiques, protéines sans oublier aussi les molécules constitutives des membranes cellulaires) suivant deux hypothèses différentes de l'apparition endogène de la vie. La première est celle du monde protéique, dans lequel les protéines seraient à la base d'un protométabolisme ayant à terme conduit à la synthèse de l'ARN et/ou de l'ADN. La deuxième est celle du monde d'ARN dans lequel cet acide ribonucléique aurait, par ses fonctions catalytiques et autocatalytiques, participé à la formation des protéines et donc du métabolisme actuel, tout en assurant le stockage d'information génétique.

En général, l'étude de la formation des biopolymères dans des conditions prébiotiques a été jusqu'à présent globalement naturaliste, spéculant plutôt que démontrant un mécanisme chimique. Ainsi, la compréhension de la réactivité des molécules organiques simples pour former des molécules plus complexes est considérée comme la première étape sur le chemin de l'apparition de la vie. Qu'il s'agisse de la première ou de la deuxième hypothèse, les chercheurs ont suivi deux voies distinctes de synthèse : en solution et sur des surfaces

minérales. Avant l'apparition de la vie, durant la phase prébiotique, existait certainement un monde minéral riche en complexité et évolutif, comme le mentionnent les travaux de R. Hazen. Certes, la vie sur Terre a toujours été reliée à la présence de l'eau liquide sur sa surface, mais les réactions de synthèse des molécules du vivant sont souvent défavorables en solution aqueuse.

Dès lors, on soupçonne qu'une bonne partie de la chimie prébiotique a pu se dérouler dans d'autres environnements, et notamment aux interfaces avec des phases minérales. Comment et jusqu'à quel degré la composition du monde minéral a-t-elle influencé, facilité, orienté ou au contraire inhibé et défavorisé la structuration des biomolécules primitives, dont les précurseurs étaient fournis par la chimie prébiotique ou les météorites ?

La recherche sur la synthèse des monomères est relativement bien avancée, témoins les travaux menés sur la chimie du formamide pour la synthèse des bases azotées ou sur la chimie du formaldéhyde pour la synthèse de sucres ou des acides aminés. Pour être biochimiquement actifs, celles-ci doivent se polymériser en acides nucléiques et en protéines. Cependant, la recherche sur la synthèse des biopolymères n'est pas aussi bien décrite, même si des études spectaculaires ont été réalisées depuis 50 ans. En effet, toutes ces réactions de polymérisation sont défavorisées en solution, de sorte que les quantités d'oligomères assez longs sont faibles - et cela avant même de prendre en compte la sélectivité de polymérisation, car la probabilité d'obtenir un polymère "porteur de sens" est infime.

En solution, la condensation des acides aminés a souvent été menée à l'aide de HCN ou d'autres activateurs. Même si la présence de certains de ces composés n'est pas à exclure dans un environnement prébiotique, l'utilisation d'activateurs chimiques pourrait être perçue comme une astuce de chimiste pour palier au problème thermodynamique de certaines réactions. En tout état de cause, cela complexifie beaucoup le système chimique: les réactions proposées nécessitent de forte concentration de réactifs, et font parfois appel à des intermédiaires réactionnels instables. Les travaux de J. Sutherland présentent un bon exemple de cette complexité réactionnelle. Son idée de base est de réaliser la synthèse de nucléotides non canoniques à partir d'un précurseur commun à la base et au sucre. Malgré l'obtention avec de bons rendements de protonucléotides non canoniques, la réalisation de ces réactions dans un environnement prébiotique, a priori pauvre en molécules organiques, reste difficile et peu probable. De plus, un des intermédiaires réactionnels de cette réaction, la cyanamide, est un composé thermodynamiquement instable qui tend à polymériser.

Bien qu'il soit possible de concevoir plusieurs voies réactionnelles, il est essentiel de s'attacher à rendre ces scénarios compatibles avec un environnement géochimique réaliste de la Terre primordiale (milieu réducteur, radiations ultra-violettes énergétiques, température élevée) et chimiquement viable (faible dilution, pas d'activateurs chimiques, présence de catalyseurs).

A notre avis, le problème principal de ces études est relatif à la présence de l'eau comme solvant du milieu réactionnel. Par extension, une synthèse prébiotique en phase liquide, probablement donc en milieu dilué, a des chances limitées d'être réalisée. Ceci a été initialement énoncé par Bernal en 1951. Statistiquement, les réactifs ont peu de chance de se rencontrer et si un activateur chimique doit entrer en jeu pour initier la réaction, la probabilité semble quasiment nulle que cela se produise, même sur des temps géologiques. En effet, la présence de l'eau dans un système réactionnel qui libère de l'eau rend ce dernier défavorable thermodynamiquement, ce qui empêche la complexification des molécules d'intérêt biologique.

Par contre, ce problème thermodynamique de condensation pourrait en théorie être levé par l'utilisation de minéraux. Cette hypothèse a été formulée pour la première fois par Bernal qui a considéré l'eau comme paramètre majeur qui empêche les réactions de se dérouler et proposé qu'en conséquence, l'adsorption sur une surface minérale pouvait être une réponse à ce problème. Plus précisément, l'objectif d'une adsorption est triple : concentrer les molécules, diminuer l'activité de l'eau en permettant le séchage (levant ainsi l'écueil principal) et dans certain cas, utiliser le caractère catalytique de la surface minérale en elle-même par le biais de ses fonctions chimiques. D'autre part, des travaux actuels étudient l'enrobage de minéraux par des lipides et sa conséquence sur la libération de biopolymères adsorbés. Cela pourrait ouvrir la voie à l'étude de protocellules et donc aux premières étapes du métabolisme.

Malheureusement, les progrès vers la compréhension fondamentale de la réactivité molécule-surface minérale sont assez lents car les systèmes impliqués ont toujours été étudiés de façon très phénoménologique, et essentiellement par des scientifiques de culture biologique. L'approche "réactivité de surface" reste très peu représentée, les efforts étant portés vers l'analyse des solutions de désorption.

Dans ce contexte prébiotique, le but et l'originalité de mon travail ont été de réaliser la synthèse *in-situ* d'un nucléotide sur des surfaces de silices et d'argiles par la condensation de

ses trois constituants (sucre, base azoté et phosphate inorganique). Les recherches menées au LRS depuis plusieurs années, par exemple sur la condensation des acides aminés en peptides, permettent de mieux comprendre les bases, et le potentiel, de la formation de liaisons "de haute énergie" entre petites biomolécules sur des surfaces minérales.

Le challenge majeur a été d'étudier pour la première fois à l'échelle moléculaire la stabilité et la réactivité *in-situ* des monomères adsorbés puis des molécules formées par activation thermique. Dans notre démarche, on a considéré uniquement des réactions de condensation en l'absence d'activateurs chimiques : la condensation de phosphates, la phosphorylation du ribose, la glycosylation de l'adénine et la condensation de nucléotides. Ce travail présente donc un premier exemple sur l'étude *in-situ* des réactions de condensation sur des surfaces minérales en l'absence d'activateur chimique avec comme objectif de comprendre le lien entre l'interaction molécules/surface et la réactivité chimique dans un environnement prébiotique.

Le manuscrit sera divisé en 5 chapitres. Le premier abordera l'état de l'art en exposant le contexte prébiotique et chimique de cette problématique. Le deuxième présentera les techniques et les méthodes qui ont été utilisés lors de ce travail. Le chapitre 3 est le premier dans notre démarche expérimentale, il se concentrera sur la réactivité thermique du ribose avant et après adsorption sur la surface de la silice, en présence et en absence des sels métalliques, afin de déterminer si cette molécule peut être suffisamment stabilisée pour servir de base à la formation de l'ARN. Le chapitre 4 est le cœur de notre travail, il présentera la chimie des réactions de formation de l'adénosine monophosphate (AMP) par activation thermique sur la surface de la silice amorphe. Dans ce chapitre on présentera d'abord la réaction de condensation de phosphates inorganique, puis la réaction de phosphorylation de ribose, ensuite la glycosylation de l'adénine en absence et en présence de phosphate, et enfin la réaction de condensation de deux nucléotides (AMP-UMP). Le dernier chapitre abordera un deuxième exemple de surface minérale, fourni par des argiles de la famille des smectites. Ce chapitre approchera la même étude (réaction de formation d'AMP) mais cette fois ci sur la saponite. Une discussion générale permettra de mettre en perspective l'ensemble de ses travaux et clôturera ainsi notre étude.

L'ensemble de ces études a suivi une démarche analytique systématique, aussi bien dans la préparation des échantillons que dans les analyses physicochimiques. Les résultats de RMN

du solide ^{31}P et ^{13}C ont ainsi été utilisés afin de déterminer l'interaction molécules / surfaces mais aussi la nature des molécules adsorbées. Conjointement des analyses d'infrarouge *in situ* ont permis de soutenir nos interprétations RMN. Des analyses thermiques (ATG-DTG) et des analyses de diffractions de rayons X ont permis aussi de caractériser, pour le premier les gammes de température chimiquement intéressantes et pour le second, la présence de phases cristallines.

Chapitre I

Etat de l'Art

II. Chapitre I : Etat de l'Art

A. Exobiologie et Terre primitive

I. Introduction à l'exobiologie

Le terme « exobiologie » fut inventé dans les années 1960 pendant le développement du programme « Apollo » de la NASA. Ce programme avait pour objectif d'envoyer des astronautes sur la lune pour collecter des échantillons et les rapporter sur la Terre. En préparant cette mission, la NASA s'est rendu compte du risque d'avoir dans ces échantillons des micro-organismes lunaires susceptibles d'interagir avec la vie terrestre et de la mettre en péril. Afin d'étudier ces risques, elle a mis en place une équipe de travail. Par suite, un des membres de ce groupe, Joshua Lederberg, a introduit le mot « exobiologie » pour désigner la science qui s'intéresse à la vie extraterrestre¹.

De façon générale, « l'exobiologie » est une science interdisciplinaire qui étudie l'origine, la distribution et l'évolution de la vie dans l'univers. Plus précisément, elle étudie les processus et les conditions, notamment géochimiques et biochimiques, pouvant mener à l'apparition de la vie et son évolution sur la Terre ou sur des exo-planètes². Cette science s'intéresse, d'une part, à rechercher d'éventuels processus présidant à l'évolution de la matière organique simple (biomolécules : chaînes peptidiques, nucléiques ou lipidiques) vers des structures plus complexes (premières cellules, systèmes génétiques,...); d'autre part, à découvrir d'éventuelles traces ou possibilités de vie sur d'autres astres connaissant des environnements différents du notre.

L'exobiologie est basée par essence sur l'interdisciplinarité, faisant intervenir la plupart des champs disciplinaires classiques. Une profonde interaction entre des domaines aussi divers que la physique, la chimie organique et inorganique, la biologie cellulaire, la géochimie, la planétologie, la climatologie et la modélisation informatique est indispensable pour tenter de comprendre et d'explorer l'ensemble des processus mis en œuvre.

L'exobiologie ne doit pas être confondue avec « l'astrobiologie » qui désigne le même domaine scientifique à ceci près qu'il inclut le futur de la vie¹.

II. Terre primitive

II.1 Formation de la Terre :

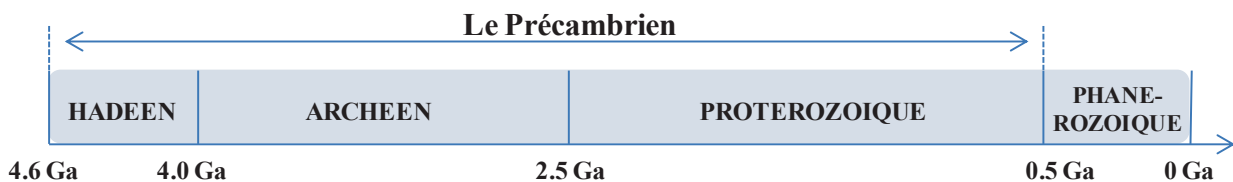
La Terre est la seule planète vivante connue. Elle est née y a $4,566 \pm 0,005$ Ga (milliards d'années) au sein de l'Univers³, dans la galaxie appelée «voie lactée». Cette datation repose sur des preuves

scientifiques provenant de la datation radiométrique des météorites et est cohérente avec l'âge des échantillons des plus anciennes roches lunaires et terrestres connues.

L'histoire de la Terre a commencé quelques milliards d'années après le fameux Big bang. Ce dernier, à l'origine de la naissance du système solaire et de la Terre, a eu lieu 13,7 Ga auparavant. Par ailleurs à 4,56 Ga, un vaste nuage de gaz et de poussières existait à certains endroits de la voie lactée. Progressivement, les poussières se sont agglomérées pour former le soleil, autour duquel gravitait un disque de poussières. Sous l'effet du vent solaire, les poussières résiduelles se sont également agglomérées en amas de matière rocheuse. Des collisions de ces derniers ont eu lieu aboutissant parfois à des explosions. Ultérieurement, les amas ont été regroupés et ont formé les protoplanètes dans le système solaire interne. La collision et le fusionnement de ces protoplanètes ont été à l'origine de la formation des planètes dont la Terre, Vénus, Mercure et Mars. A noter que notre Terre a été formée sur une période de 30 millions d'années.³⁻⁴

II.II Conditions de la terre primitive

80 % de l'histoire de la terre s'est déroulée durant le Précambrien. Cette période est la plus longue sur l'échelle des temps géologiques. Elle s'étend de la formation de la terre (4,56 Ga), à l'émergence des animaux pluricellulaires (542 Ma) qui marque l'entrée dans la première période de l'ère Paléozoïque, le Cambrien.



i. Formation de l'océan magmatique

La période de l'Hadéen commence avec la formation de la terre (4,568 Ga) et se termine il y a 4 Ga. Durant les 100 Ma qui suivent l'agrégation, la terre aurait subi une pluie intense d'objets cosmiques (poussières, planétoïdes, astéroïdes). Les impacts de ces objets sur la surface de la terre ont libéré des quantités considérables de chaleur. Aucune convection interne n'était encore établie empêchant ainsi son évacuation. Il en a ainsi résulté une fusion de toute la partie externe de la jeune planète. Ceci a donné naissance à un océan magmatique.

ii. La différenciation

Pendant l'« Hadéen », un autre événement a eu lieu aussi, la différenciation. Les éléments les plus lourds, comme le fer et le nickel, se sont concentrés au centre pour former le noyau. Cette formation a déclenché l'apparition du champ magnétique terrestre. Ce dernier protège jusqu'à nos jours la

surface de la Terre du vent solaire. Les silicates, plus légers, se rassemblent autour du noyau en constituant le manteau. Les éléments volatiles, comme l'eau, l'azote et l'hydrogène se dégagent à la périphérie en se mélangeant à d'autres constituants de l'atmosphère primitive.^{3, 5}

iii. Formation de l'hydrosphère

Il y a 4,4 Ga, la température de la surface de la planète était suffisamment basse pour permettre à l'eau d'être à l'état liquide. Un réseau hydrographique et des bassins sédimentaires sont apparus à partir de la vapeur d'eau présente dans l'atmosphère primitive. Des vastes étendues d'eau, des océans, existaient à la surface de la terre. Durant cette période, l'océan magmatique s'est refroidi et progressivement solidifié. Sa cristallisation a donné naissance à certains minéraux : olivine, orthopyroxène, clinopyroxène, plagioclase. A cette époque, l'hydrosphère primitive contenait des matières minérales diversifiées avec une quantité très importante de CO₂ dissous (HCO₃⁻) et de fer.⁶

iv. Formation de la croûte continentale

Pendant la même période, la croûte continentale a commencé à se former sur terre. Puis, la couche superficielle a durci et résisté de mieux en mieux aux chocs. Sa genèse a continué tout au cours de l'Hadéen. La datation de la proto-croûte continentale est basée sur l'âge des cristaux de zircon sédimentaire de Jack Hills (Australie). Ces cristaux ont révélé une gamme d'âge allant de 4,4 à 4 Ga. Les roches dans lesquelles ces minéraux ont cristallisé ont été altérées et ont disparu. Seuls les cristaux de zircon sont préservés. Ils ont cristallisé dans un magma de type granite. Les granites étant les constituants quasi exclusifs de la croûte continentale. Cette étape est de grande importance pour la chimie prébiotique. Elle indique que les conditions nécessaires (eau, continent) à l'apparition et au développement de la vie étaient potentiellement réunies moins de 150 Ma après l'accrétion de la planète.⁷

v. Bombardement météoritique

Le plus important événement de l'Hadéen est le bombardement météoritique, « late Heavy Bombardement ». Il a eu lieu entre 3,95 et 3,87 Ga suite à une modification des orbites de Jupiter et de Saturne. Plusieurs scénarios ont décrit ce phénomène. Ils ont montré que la période où cette pluie s'est abattue sur la terre coïncide avec l'apparition de la vie. Ce phénomène a pu apporter de grandes quantités de métaux, dont le cuivre, le fer, le nickel, le calcium et l'aluminium. Bien que ce bombardement ait aussi apporté certains types de molécules organiques, il est supposé avoir rendu la Terre inhabitable pour les premières formes de vie.⁵

vi. Passage du non-vivant au vivant

Le passage d'une chimie prébiotique aux premières cellules a dû se dérouler entre 4,3 Ga et 2,7 Ga. Comme noté précédemment, la croûte continentale et les océans, nécessaires à l'apparition de la vie, étaient en place dès 4,4 Ga. La limite de 2,7 Ga correspond aux plus anciens stromatolithes découverts, structures représentatives de l'activité de communautés procaryotes. L'apparition d'ARN primitifs pourrait être placée au début de l'Archéen.

vii. L'atmosphère primitive

L'atmosphère primitive était anoxique et plutôt réductrice en raison de l'absence d'O₂. En 1952, le chimiste Harold Urey l'a considérée comme principalement constituée d'hydrogène H₂, méthane CH₄, azote N₂ et ammoniac NH₃. L'allumage de la centrale nucléaire solaire, il y a 4,4 Ga, a produit un souffle très violent qui a emporté les gaz les plus légers des planètes proches du soleil vers les plus lointaines. Il ne reste alors que les gaz lourds comme le méthane, l'ammoniac et l'acide cyanhydrique. Le champ de gravitation (plus intense que sur la Lune) a permis de retenir autour de notre planète une partie de cette atmosphère primitive.⁸ Les autres gaz présents dans l'atmosphère ancienne ont été libérés de la croûte terrestre sous l'effet des éruptions volcanique.

viii. Océan primitif

Dans un second temps, une atmosphère secondaire s'est formée (4 à 3,3 Ga). La forte quantité de vapeur d'eau présente dans l'atmosphère entraîne la formation des océans. L'eau de pluie chargée en CO₂ est acide. Elle use les roches volcaniques en dissolvant entre autres éléments du calcium. Le CaCO₃ formé va diminuer de façon importante la teneur en dioxyde de carbone de l'atmosphère et la vapeur d'eau va précipiter sous forme liquide. L'ensemble de ces événements (baisse du taux de CO₂ et de la vapeur d'eau) fait que l'azote devient le constituant majeur de l'atmosphère terrestre.

L'effet de serre engendré par le dioxyde de carbone va diminuer et la température de la surface va baisser. La température supposée du manteau Archéen varie d'un auteur à l'autre mais le modèle le plus récent montre qu'elle n'a pas dépasser les 200°C (entre 100 et 200°C). La température des océans Archéens est aussi un sujet polémique. Bien que tous les chercheurs soient d'accord sur le fait que ces océans ont été plus chauds qu'aujourd'hui, ils sont en désaccord sur la valeur. D'après l'analyse du rapport isotopique ¹⁸O/¹⁶O de certaines roches de l'Archéen, des géochimistes ont déduit que tout au long de cette période, la température de l'eau de surface varie entre 55 et 85°C, figure II-1. Au début de la période protérozoïque, cette température a diminué jusqu'à arriver à sa température actuelle⁹.

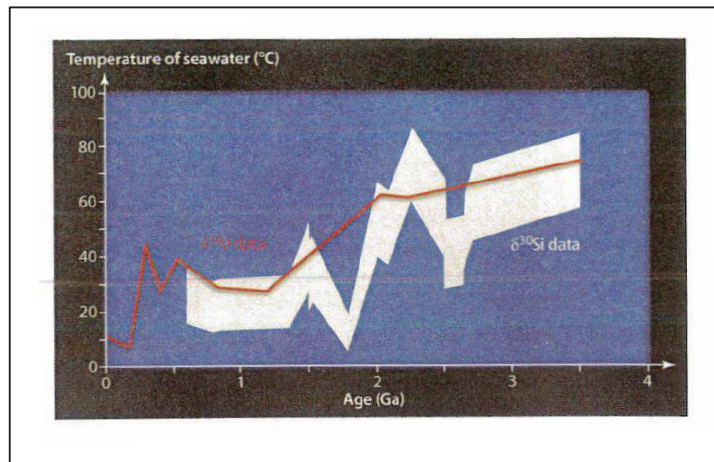


Figure II-1 : Evolution de la température de l'eau océanique tout au long de l'histoire de la Terre. Les mesures ont été effectuées sur des Cherts de différents âges. La partie jaune correspond aux températures calculées à partir des isotopes de Silicium ($\delta^{30}\text{Si}$) tandis que la courbe rouge provient des isotopes d'oxygène ($\delta^{18}\text{O}$)⁵.

D'autre part, des roches carbonatées ont été formés dans l'océan primitif par précipitation de carbonate, principalement la calcite (CaCO_3), la dolomite ($[\text{Ca}, \text{Mg}] \text{CO}_3$) et dans une moindre mesure la sidérite (FeCO_3). Ceci montre que les océans primitifs ont été riches en Mg^{2+} et Ca^{2+} . En même temps, ils ont estimé que le rapport de $\text{Ca}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ est égal à 250 dans l'océan Archéen tandis qu'il est de 10^7 aujourd'hui. D'autre part, les concentrations en Na^+ et Cl^- sont deux fois plus élevées, celle du Ca^{2+} environ 20 fois plus grande. La concentration en Mg^{2+} est équivalente tandis que celle en sulfate est vingt fois moins importante qu'aujourd'hui⁸⁻⁹, figure II-2.

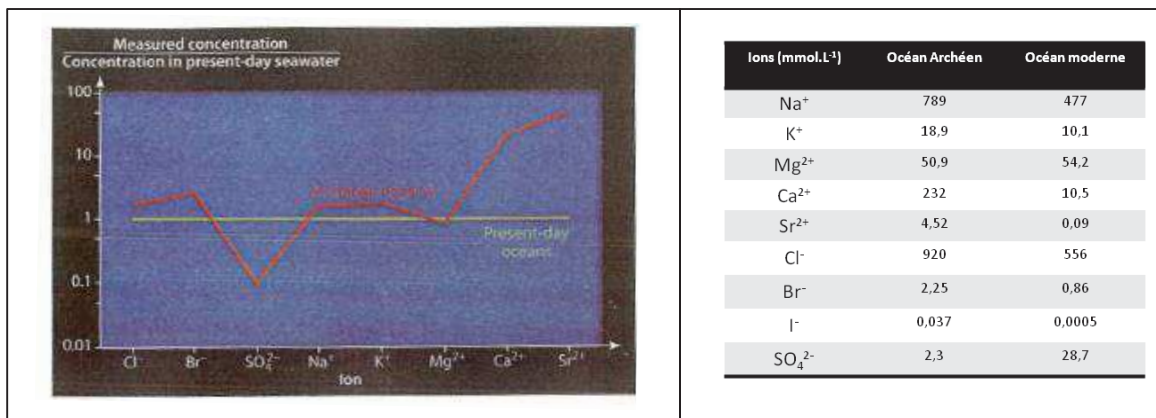


Figure II-2 : La concentration des ions dissous dans l'océan Archéen (courbe rouge) par rapport à celles dans l'océan actuel (vert) en mmol.L^{-1} .⁵

L'océan primitif est donc globalement réducteur et riche en sels.

ix. Photochimie

En décrivant toutes ces conditions, il est indispensable d'explorer la photochimie de la Terre primitive. Durant l'archéen, le spectre de la lumière solaire était différent. Le rayonnement UV était plus énergétique car la couche protectrice d'ozone n'existait pas. Les radiations solaires étaient

vraisemblablement la source d'énergie la plus importante sur la Terre primitive. L'action de la photochimie sur les réactions prébiotiques est donc un paramètre intéressant. Il a pu fortement influencer la synthèse des premiers composés organiques.

Pour résumer, les océans archéens auraient donc été plus acides, salés, et chauds que les océans actuels. Toutefois, la lumière du soleil primitif étant estimée plus faible, d'environ 20% par rapport au soleil actuel, la température de surface n'aurait pas pu dépasser les 15°C sans la présence d'un effet de serre important.^{8,10}

x. Avènement de la photosynthèse oxygénique

Considérant le métabolisme contemporain, l'atmosphère primitive n'aurait pas été viable en raison de la faible proportion d'O₂. Néanmoins, une telle atmosphère pouvait être exploitée par des organismes anaérobiques, chimiolithoautotrophes par exemple. La vie à l'échelle cellulaire apparaît sous forme de bactéries, il y a 3,6 Ga. Les premiers êtres vivants ont un métabolisme anaérobique. Plus tard, peut-être entre 3,5 et 3 Ga, des cyanobactéries apparaissent, premiers êtres vivants qui ont réalisé la photosynthèse. La libération d'O₂ a engendré notamment l'oxydation de certains métaux tels que le Fe²⁺ en Fe³⁺ puis sa précipitation en hydroxyde de fer, formant des « roches rubanées ». Sur la Terre moderne, la teneur élevée en oxygène a permis la formation photochimique de la couche d'ozone (O₃)⁸.

III. Théories sur l'apparition de la vie sur Terre

Les origines de la vie, de l'échelle moléculaire à l'échelle cellulaire, ont été et sont toujours l'objet de nombreuses controverses et malgré les nombreuses tentatives de recherche scientifique sur les origines de la vie, nous sommes encore loin d'avoir trouvé un scénario qui fasse l'unanimité.

III.1 Les premières théories :

Plusieurs théories visant à comprendre les origines de la vie se sont succédé depuis l'antiquité jusqu'au XX^{ème} siècle. Certaines théories peuvent nous apparaître aujourd'hui farfelues, cependant il faut tenir compte des connaissances acquises à chaque époque. Selon Anaximandre de Milet (610 à 546 av J.C.), la vie apparaît suite à l'évaporation de l'eau sur la Terre par le soleil. Empédocle (490 à 435 av J.C.) pense que les organes séparés se rassemblent pour former un seul être et Démocrite (460 à 370 av J.C) décrète que la vie est issue de vers sortant de la boue pour former des êtres vivants.¹¹

III.II La génération spontanée ou abiogénèse : « du rien à la vie »

C'est Aristote (384 à 322 av. J.C.) qui a formulé la thèse de la génération spontanée : « Les plantes, les insectes, les animaux peuvent naître de systèmes vivants qui leur ressemblent, mais aussi de la matière en décomposition activée par la chaleur du soleil ».

Paradoxalement, l'approche scientifique a abouti à approfondir le mystère de l'origine de la vie puisque Pasteur a pu invalider cette théorie par l'expérience de ses *ballons à col de cygne* et sa découverte de la pasteurisation.

III.III Le créationnisme :

Le créationnisme suppose que c'est un être supérieur, le plus souvent un Dieu, qui est à l'origine de la création de l'Univers et de la vie. C'est une réponse traditionnelle, du domaine de la foi et non de la science ; elle n'est pas faite pour être interrogée scientifiquement.

III.IV La panspermie : « la vie extraterrestre »

La Vie serait venue du Cosmos. Cette nouvelle théorie a été développée par l'Allemand H.E.Richter en 1861. Selon lui, les corps célestes libèrent des particules qui contiennent des germes de microorganismes, qu'il appelle cosmozoaires, et qui ont été amenés sur Terre par les météorites.

L'idée a été reprise en 1906 par le savant suédois Svante Arrhenius, mais sous une forme plus élaborée : la panspermie. Cette théorie considère que la Terre aurait été «ensemencée» par des molécules organiques. De nombreuses substances organiques sont en effet détectées dans les météorites tombés sur la Terre, comme des acides aminés. Alors, les premières formes de vie seraient-elles venues de l'espace ? C'est possible, mais cela ne fait que déplacer la question, puisqu'on ne sait toujours pas comment les premières formes de vie de l'univers sont apparues.

III.V La théorie d'Oparin-Haldane :

C'est dans les années 1920 que l'évolution de la matière inanimée vers la matière vivante a commencé à être considérée comme un problème scientifique traitable. Oparin fut le premier à mettre en évidence l'importance de la chimie dans l'atmosphère, l'hydrosphère et la lithosphère sur les différentes étapes de l'histoire géologique. Il a aussi établi un lien entre les processus chimiques prébiotiques et les processus biochimiques fondamentaux. Quant à Haldane, il a développé, en 1929, une théorie qui confirme l'une des propositions fondamentales d'Oparin : « la vie a pris naissance dans des conditions anaérobiques, sans oxygène ».

Selon eux, au moment de la formation de la terre, il y a 4,55 Ga, des réactions chimiques ont abouti à la formation de la matière organique. Ces réactions se basent sur la composition chimique

(notamment contenus en C, H, O, N) et sur une source d'énergie (le Soleil). Elles ont eu lieu dans l'atmosphère terrestre entre des réactifs émis par le soleil et aussi par la Terre. D'un côté, les éléments du cœur de soleil tels que l'hydrogène, l'oxygène, l'azote et le carbone se combinent vite à l'hydrogène de l'atmosphère solaire pour former des gaz, comme le méthane, l'ammoniaque et la vapeur d'eau qui sont transmis à l'atmosphère terrestre.

D'un autre côté, on a l' H_2O , le CO_2 et le H_2S , qui se trouvent dans l'atmosphère terrestre suite à l'évaporation des volcans. Toutes ces molécules réagissent dans l'atmosphère de notre planète pour donner naissance aux premières molécules organiques.

Il faut tenir compte entre autres de la présence des radicaux très réactifs dans l'atmosphère. Ce sont les produits de la décomposition des molécules simples de l'atmosphère primitive sous l'effet des radiations UV du soleil. Ces radicaux se combinent pour former des molécules plus complexes. Suite à la pluie, ces nouvelles molécules peuvent donc tomber dans les océans. Toutes ces molécules organiques constituent la "soupe primitive". Enfin, dans ce bouillon primitif, ces molécules organiques auraient progressivement évolué vers les molécules vivantes.

i. L'expérience de Stanley Miller

L'expérience de Stanley Miller¹² constitue la première tentative de tester la théorie d'Oparin-Haldane.

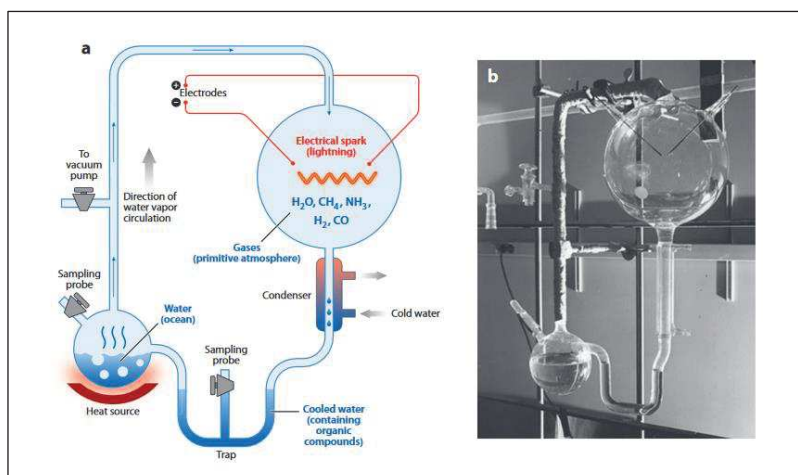


Figure II-3 : L'appareil de décharge-étincelle utilisé dans les expériences de Miller-Urey, (a) dessin schématisé, (b) photos de l'appareil prise par Stanley Miller.^{12b}

Au milieu des années 1950, il a tenté de reconstituer en laboratoire les conditions postulées par Oparin-Haldane au moyen de l'expérience représentée par la figure I-3. Son montage consiste en un réacteur fermé et stérile dans lequel il peut faire le vide. Dans un ballon contenant de l'eau (H_2O), il a introduit du CH_4 , du H_2 et du NH_3 . Dans ce montage, il a ajouté deux électrodes qui produisent

des étincelles pour simuler les éclairs : c'est la source d'énergie. Un réfrigérant est aussi présent, il amène la condensation de la vapeur d'eau qui entraîne avec elle les molécules nouvellement formées : c'est la pluie. Finalement, le tout s'accumule dans la base du montage : ce sont les océans primitifs. Malgré toutes les difficultés, Miller a réussi à analyser la « soupe primitive » produite dans ce montage. Il a pu isoler un certain nombre de molécules, et surtout à démontrer qu'il avait produit ces fameuses molécules organiques prédites par Oparin-Haldane y compris certains acides aminés.

III.VI Les argiles et le vivant

John Desmond Bernal, un cristallographe anglais, fut un des premiers à proposer en 1950 que l'origine de la vie pouvait se trouver dans les propriétés catalytiques des argiles. Ces minéraux, très répandus sur la planète, auraient permis la polymérisation des petites biomolécules¹³. En 1960, l'idée a été reprise et plus longuement développée par Cairn-Smith¹⁴. Selon lui, les argiles semblent constituer un excellent matériau de départ - il a même été jusqu'à suggérer que les argiles pouvaient elles-mêmes être considérées comme une forme de vie primitive. Elles peuvent adsorber les molécules organiques et faciliter leurs rencontres en évitant le problème de dilution dans l'océan. Plus récemment, Ferris et Orgel ont réussi à former des petites chaînes peptidiques (sur illite et hydroxyapatite) et nucléiques (sur montmorillonite) d'une longueur supérieure à 55 éléments. Or on considère qu'une chaîne d'acides nucléiques composée de l'enchaînement de 30 à 60 monomères pourrait former la base d'un système génétique viable¹⁵.

IV. Les témoins de la naissance de la vie sur Terre

IV.I Les premières formes de la Vie sur Terre : anciens fossiles

La vie telle que nous la connaissons aujourd'hui est donc le produit d'une évolution d'à peu près 4 milliards d'années. Elle a sans doute subi de nombreuses modifications depuis les premiers systèmes vivants. Alors, où et comment trouver ce « premier vivant » qui, par une longue évolution biologique, a donné naissance à tous les organismes vivants actuels ?

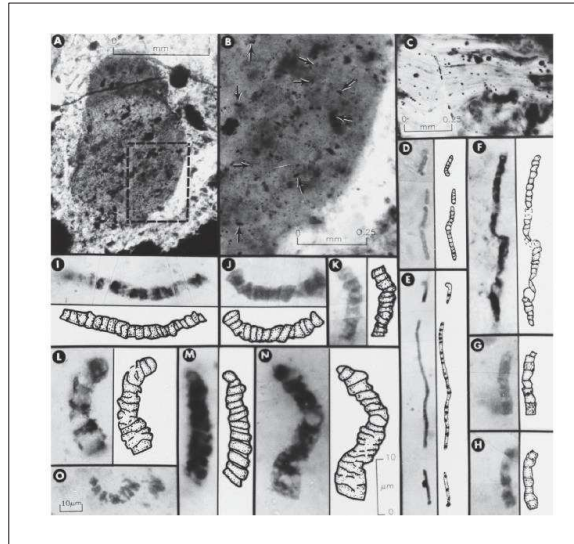


Figure II-4 : Les plus anciens fossiles connus : Apex Chert (Photo W.Schopf).¹⁶

Deux types de fossiles pertinents ont été trouvés dans les anciennes couches géologiques: les fossiles comprenant des structures microscopiques qui ressemblent à des organismes présents dans des sections minces de roches, et les stromatolithes macroscopiques de structure laminaire d'origine à la fois biogénique (cyanobactéries) et sédimentaire¹⁷. Ce sujet a été profondément examiné et débattu par Walter¹⁸, Schopf (1983¹⁹, et plus récemment²⁰).

Les premières preuves de microfossiles bien établis semblent être celles du chert d'Apex. Ce sont des structures filamenteuses cellulaires datées d'environ 3,465 Ga qui ressemblent beaucoup à des cyanobactéries modernes en taille et en forme¹⁶. Ces microorganismes fossilisés dans des roches sédimentaires siliceuses ont été trouvés en Australie par le paléontologiste William Schopf (1993, 2002) et en Afrique du Sud par Westall (2001). Ils ont d'abord été interprétés comme les plus anciens microfossiles mis en évidence (Schopf) mais réinterprétés plus récemment comme des artefacts possibles d'origine hydrothermale (Brasier).

D'autre part, les roches sédimentaires les plus vieilles du monde se trouvent dans les ceintures de « roches vertes » d'Isua et d'Akilia au Sud-Ouest du Groenland. Les sédiments d'Isua datent de 3,8 Ga, ceux d'Akilia de 3,85 Ga. Ils témoignent de la présence de l'eau liquide et de gaz carbonique dans l'atmosphère primitive et renferment de la matière organique sous forme de « kérogènes »⁹. L'enrichissement en carbone 12 de la matière organique suggère mais ne prouve pas la présence d'une activité photosynthétique biologique, donc d'une vie primitive il y a 3,85 milliards d'années¹⁷. En effet, des processus géologiques comme le métamorphisme peuvent aussi provoquer cet enrichissement⁹. En fin de compte, les premières traces de vie certaines remontent à -2,7 milliards d'années (Archéen supérieur) et sont constituées de fossiles moléculaires de lipides biologiques incontestables.

L'apparition de la vie n'est donc pas précisément datée et se situe dans une fourchette extrêmement large allant de $-3,8$ à $-2,7$ Ga.

La vie sur Terre a gardé pendant longtemps une forme primitive unicellulaire. Pendant quasiment tout le précambrien, jusqu'à -680 millions d'années (protézoïque supérieur), les seuls êtres vivants étaient des organismes unicellulaires, d'abord procaryotes ($-2,7$ Ga). Les eucaryotes (dans lesquels l'ADN est enfermé dans un noyau) n'apparaissent que tardivement ($-1,5$ Ga)²¹. Les premières traces d'animaux pluricellulaires n'apparaissent qu'à l'extrême fin du Précambrien.

IV.II Les molécules de la Vie : ARN, ADN, protéines, lipides

Les scientifiques ne disposent d'aucun indice véritable leur permettant de reconstituer les premières étapes de l'apparition de la vie. En se basant sur ce qu'ils savent des êtres vivants, ils supposent que les formes initiales de la vie se sont construites à partir des molécules organiques, les constituants de base des êtres vivants (glucides, lipides, protéines et acides nucléiques). Actuellement, il existe deux écoles de pensée principales sur l'origine de la vie^{12a, 22}:

1. « Métabolisme d'abord », ce modèle rejette l'idée de l'autoréplication d'un gène « nu ». Il se base sur l'apparition d'un métabolisme primitif qui aurait précédé l'émergence de la réplication de l'ARN. Une des premières versions de cette hypothèse fut présentée en 1924 par Alexander Oparin avec son idée de vésicules primitives capables de se répliquer, à une époque où on ne connaissait pas encore la structure de l'ADN²³.
2. « Gène d'abord », dans ce modèle l'apparition du génome a précédé l'apparition du métabolisme. Les « individus » sont représentés par les molécules d'acide nucléiques elles-mêmes, (initialement on pensait à de l'ADN, mais plus probablement de l'ARN, cf. infra). Des molécules d'acides nucléiques auraient ainsi existé seules, s'auto-répliquant à partir des molécules présentes dans leur environnement.

Ces deux modèles posent la question du paradoxe de l'œuf et de la poule²³. Pour qu'il y ait la vie, la présence d'une molécule génétique capable de se répliquer (ADN) est nécessaire. Elle contient les informations nécessaires à la production de protéines qui sont à la base du fonctionnement de la vie. Cependant, les cellules ne peuvent maintenir, dupliquer l'ADN sans ces mêmes protéines. De plus, cette machinerie ADN-protéine nécessite d'être compartimentée à l'aide de membranes faites de lipides pour fonctionner. Et ici aussi, ces lipides nécessitent l'action de protéines pour être synthétisés.²⁴

Alors acides nucléiques, protéines, lipides : qui est apparu en premier ? Actuellement, les recherches sont orientées dans les deux directions précédemment détaillées. Chaque orientation se base sur certains critères et données qui l'appuient, par ex :

1. La théorie du monde ARN (Walter Gilbert 1986) : En plus de son rôle dans la transmission de l'information génétique, l'ARN peut fonctionner à la fois comme un gène et comme un catalyseur. Les ribozymes, découverts dans les années 1980 (par Thomas Cech et Sidney Altman) montrent que les ARN catalysent leur auto-coupage et leur ligation sans intervention d'enzymes protéiques. La formation de liaisons peptidiques entre les acides aminés découverte dans les années 2000 a montré que le ribosome est un ribozyme.

Selon cette théorie, les ARN originels fonctionnaient sans enzymes, étant eux-mêmes capables de remplir le rôle de certaines enzymes indispensables à l'émergence et au maintien d'une vie minimale. De nombreux indices viennent étayer cette hypothèse. La présence actuelle de coenzymes ribonucléotidiques (NAD, NADP, FAD), indispensables à l'activité de nombreuses enzymes du métabolisme cellulaire ; la présence des introns autocatalytiques ; l'uracile nécessaire à la synthèse de thymine dans la biogénèse des nucléotides au sein des cellules ; ou encore la nécessité d'une amorce ARN pour la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase sont des exemples de preuves appuyant l'antériorité de l'ARN. Le présent travail serait d'un point de vue logique bien complémentaire avec le scénario du monde ARN .^{24a 24b, 25}

2. La théorie de la coévolution qui prévoit l'apparition à peu près simultanée sur Terre des protéines et des ARN. Selon John Sutherland, imaginer l'assemblage abiotique d'une cellule (acides nucléiques, protéines, lipides) présente des grandes exigences sur la chimie prébiotique hypothétique. Cependant, il a montré que la combinaison de molécules simples et abondantes à l'époque de l'apparition de la vie peut donner naissance à une suite de réactions chimiques permettant la production des trois types de molécules nécessaires à la vie : nucléotides, protéines et lipides.²⁶

B. Acides nucléiques et nucléotides

I. Découverte

Le médecin suisse Miescher isola en 1869, à partir de leucocytes de pus de plaies infectées, une substance organique remarquablement riche en phosphore qu'il baptisa nucléine. Sa nature chimique fut élucidée par les travaux initiateurs de KOSSEL à partir de 1882 jusqu'à ceux de LEVENE en 1927 : il s'agissait de l'acide désoxyribonucléique dont l'abréviation est ADN (DNA : anglo-saxon),

polymère d'unités dénommées nucléotides. En 1953, Rosalind Franklin, James Watson et Francis Crick ont découvert la structure en double hélice de l'ADN.²⁷

II. Structure

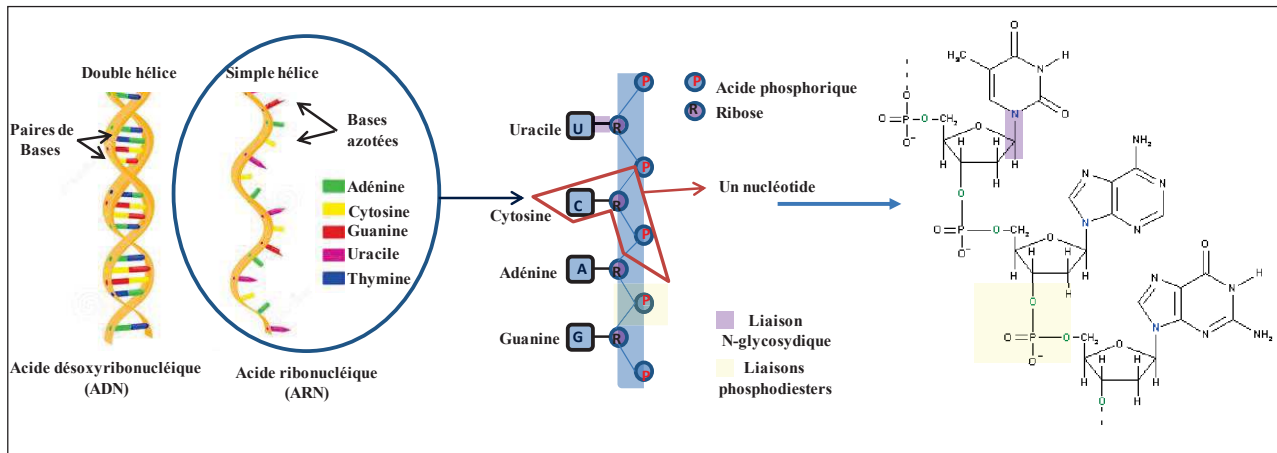


Figure II-5 : La structure des acides nucléiques : ADN, ARN.

Les acides nucléiques sont des biomolécules de séquence variable. L'unité de base de ces polymères est le nucléotide. Les nucléotides sont reliés entre eux par des liaisons phosphodiesteres (deux liaisons P-O-C avec un même groupe phosphate). Chaque nucléotide est constitué d'un sucre, un pentose, sous forme de l'isomère β -furanose, sur le C1' duquel est fixé une base nucléique (Uracile, Cytosine, Adénine, ou Guanine) reliée par une liaison N-glycosidique, tandis que le C5' porte un groupement phosphate. Différentes séquences de nucléotides peuvent être observées, ce qui implique des propriétés chimiques différentes des acides nucléiques.

Il existe deux types d'acides nucléiques :

1. Acide ribonucléique (ARN) : le pentose est le « D-ribose ». L'ARN est synthétisé dans la cellule à partir de l'ADN. Les cellules vivantes l'utilisent comme un support intermédiaire de l'information génétique pour synthétiser les protéines. Il peut remplir de nombreuses autres fonctions et en particulier intervenir dans des réactions chimiques du métabolisme cellulaire.
2. Acide désoxyribonucléique (ADN) : le rôle du pentose est ici joué par le désoxyribose, plus stable chimiquement, qui diffère du D-ribose par la présence en C2 d'un groupe $-\text{CH}_2-$ au lieu d'un $-\text{CHOH}-$. L'ADN contient l'information génétique, appelée génome, permettant le développement, le fonctionnement et la multiplication des êtres vivants (à l'exception des virus à ARN).

III. Acide ribonucléique :

III.1 Formation des ARN sur la terre primitive :

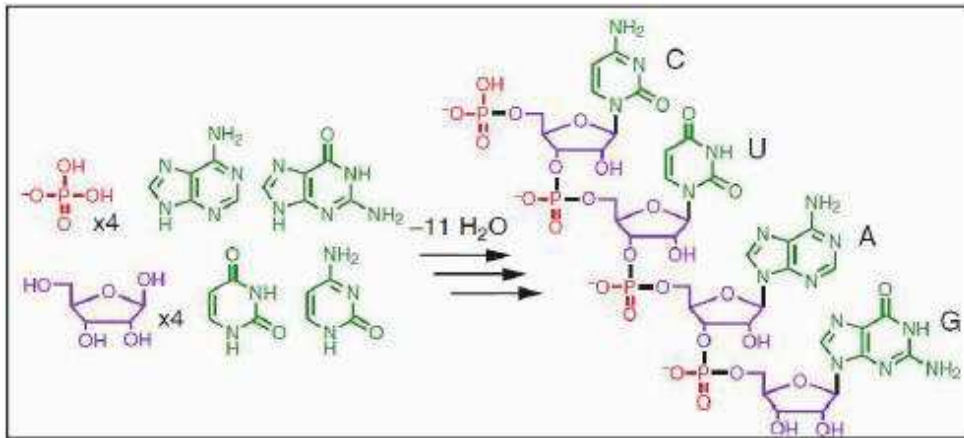


Figure II-6: Schéma représentatif de la formation d'un brin d'ARN.

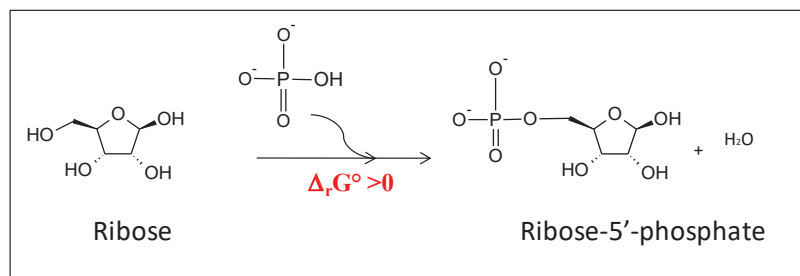
D'après l'hypothèse du « monde ARN », les polynucléotides seraient les premières espèces biochimiques à avoir émergé sur la terre primitive. Cependant l'ARN est « le cauchemar de la chimie prébiotique ». D'une part, il est formé à partir de longues combinaisons de molécules organiques reliées entre elles par des liaisons instables thermodynamiquement en milieu aqueux (les liaisons C-O-P). Cette instabilité intrinsèque le rend plus ou moins fragile en fonction des conditions environnementales (UV, pH, T), un problème détaillé dans la partie suivante.

D'autre part, la synthèse de monomères (les nucléotides) est difficile à rationaliser car ces entités semblent constituées de trois parties qui ne sont pas stables dans les mêmes conditions thermodynamiques.

L'hypothèse du monde ARN permet d'expliquer les étapes ultérieures de l'évolution (stockage de l'information génétique, catalyse des réactions chimiques) sur la Terre primitive, mais elle nécessite une préalable existence de nucléotides et nucléosides. Dans ce contexte, il existe un « modèle de synthèse discontinue » qui décrit la formation des oligomères d'ARN dans l'environnement prébiotique²⁸. Selon ce modèle, les briques de base d'ARN (ribose, phosphate, base azotée) ont été d'abord synthétisées sur la terre primitive. Le ribose et les nucléobases peuvent être formés respectivement à partir de formaldéhyde et de formamide alors que les phosphates pourraient avoir plusieurs sources, par exemple : phosphite, phosphates, polyphosphates (ces informations sont détaillées ultérieurement). Par suite, les briques de bases formées auraient été condensées en ribonucléosides et ribonucléotides. Enfin, les unités monomériques « ribonucléotides » auraient donné naissance à l'ARN par oligomérisation.

Cependant, la condensation de ces briques de base pose trois problèmes sérieux dans un contexte prébiotique :

1. La condensation des briques de base pour former des nucléotides et/ou nucléosides, ainsi que la polymérisation de ceux-ci, est défavorable en milieu aqueux, en raison de la perte d'une molécule d'eau par réaction. Il s'agit d'une application du principe de Le Châtelier : si l'on travaille dans un milieu où l'activité d'un des produits de réaction est très élevée, l'équilibre de réaction sera déplacé vers la gauche. Par conséquent, ces réactions sont interdites thermodynamiquement à moins d'être couplées à d'autres réactions thermodynamiquement favorables. Ex :



Équation II-1 : La réaction de formation du ribose-5' phosphate.

En se référant à la bibliographie, les voies de synthèse en solution impliquent des intermédiaires chimiques instables ou bien des bases azotées non canoniques²⁹. Une autre voie de synthèse est toutefois possible, elle implique la présence des **surfaces minérales**. Ces surfaces ont été prises en compte dans les processus prébiotique depuis les travaux de Bernal en 1951¹³. Ces scénarios ont été testés pour plusieurs réactions prébiotiques³⁰ comme la phosphorylation, la polymérisation des phosphates et l'oligomérisation des nucléotides. En particulier, une série de publications d'Orgel, Ferris et al a mentionné la formation des longs polymères de ribonucléotides (jusqu'à 55 monomères) en présence de minéraux notamment argileux^{15, 31}. Malgré l'importance de ces études, elles ne résolvent pas le problème thermodynamique. Elles se basent sur des nucléotides « activés » (par des groupes imidazole) dont la polymérisation est favorable thermodynamiquement ; or la présence de tels groupes activateurs dans des conditions prébiotiques pose question. Donc la condensation des briques élémentaires de nucléotides ainsi que leur polymérisation en polynucléotides capable de s'autorépliquer, sur des surfaces minérales, est un grand défi prébiotique.

2. De plus, il existe un problème de sélectivité. Si on part d'un mélange de briques de base et on suppose qu'on a une condensation quantitative, quelle est la probabilité d'avoir des molécules d'intérêt biologique ? Il existe une vaste diversité de combinaisons qui provient des différentes possibilités de liaisons phosphodiester (2'-5', 3'-5', 5'-5'..), du nombre variable d'unités phosphoriques et de la diversité anomérique (α , β) et stéréoisomérique (L, D) au niveau du sucre. En plus certaines modifications peuvent affecter la base azotée, le sucre et le phosphate, ce qui accroît encore la diversité des combinaisons.²⁵

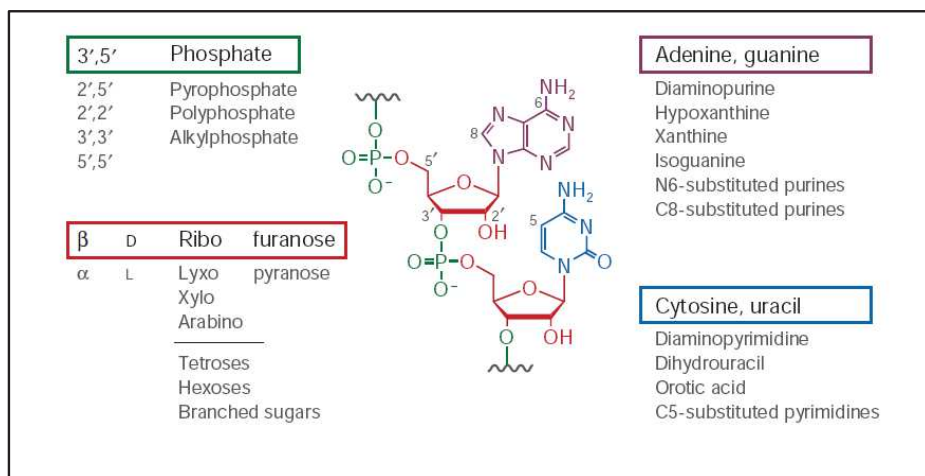


Figure II-7: La diversité de combinaisons au sein des nucléotides.²⁵

3. Enfin, la cinétique de condensation et de polymérisation est également problématique. La réaction peut littéralement prendre des siècles à température ambiante. On pourrait bien sûr l'accélérer par des activations thermiques. Mais un problème supplémentaire s'ajouterait alors : l'instabilité thermique de ces molécules.

III.II Stabilité des ARN

L'hypothèse du « monde ARN » est fortement influencée par les conditions environnementales présentes sur la terre primitive. En particulier, les rayons X, le rayonnement ultraviolet (UV), le pH, la température et la présence de sels métalliques auraient pu constituer autant d'obstacles majeurs à la formation, l'évolution et la stabilité des biomolécules.³²

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, les réactions de condensation aboutissant à la formation de ces oligomères sont défavorables thermodynamiquement en milieu aqueux, ce qui indique que l'ARN, une fois formée, aurait vite disparu sur la terre primitive !! En outre, la réaction prébiotique de formation de l'une de ses briques de base « le ribose » aboutit à un mélange de plusieurs sucres dont le ribose est une forme minoritaire³³. En plus, ce sucre n'est pas stable, il se décompose rapidement. Sa durée de demi-vie est de 73 min à 100°C et pH 7³⁴.

Sur le plan structural, le 2'OH caractérisant l'ARN catalytique, contrairement à l'ADN, le rend plus sensible à l'hydrolyse. En solution aqueuse, la liaison phosphodiester est fortement susceptible à l'hydrolyse promue par le 2'OH du ribose : celui-ci peut en effet induire la formation d'une liaison 2'3'phosphate cyclique, ce qui rompt la chaîne d'ARN. Cette réaction est accélérée à haute température et pH, et aussi en présence des métaux divalents (ou multivalents) qui se lient aux phosphates, les polarisent et augmentent leur réactivité.^{32a, b}

De nombreux auteurs ont supposé que des températures prébiotiques plus élevées que la température ambiante actuelle sont désirables pour une synthèse biologique (réactions de condensation). La vitesse de ces réactions augmente en effet avec la température, cependant le risque de dégradation des intermédiaires prébiologiques devient aussi plus important. De plus, l'augmentation de la température provoque une augmentation de la vitesse de trans-estérification de l'ARN³. Donc, des basses températures associées à un faible rayonnement solaire ont pu être nécessaire pour l'accumulation de la matière prébiologique. Par exemple, l'ATP a une durée de demi-vie de quelques années à 25°C et seulement quelques jours à 80°C même en absence des catalyseurs,³⁵ alors que celle de l'ARN est de 23 jours à 5°C³⁶, 33 min à 75°C et 5 min à 100°C³⁶. Cette observation indique que la molécule d'ARN, avec sa grande complexité, peut difficilement avoir survécu longtemps en solution et surtout à haute température. Cependant, la thermo-dégradation est inhibée par de fortes concentrations d'ions monovalents³. L'hydrosphère primitive aurait contenu des concentrations importantes de plusieurs cations mono et multivalents (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Fe²⁺,...). L'effet de ces ions métalliques est difficile à prévoir. Ils sont habituellement utilisés pour stabiliser les conformations d'acide nucléique mais ils peuvent aussi piéger les polynucléotides dans des conformations inactives (Heilmann Miller et al 2001). En plus de leurs rôles structuraux, les métaux polyvalents peuvent induire un clivage de la chaîne d'ARN (fragmentation, dépolymérisation, rupture)^{32d} ; par exemple le magnésium (Mg²⁺) pourrait vraisemblablement favoriser le clivage de l'ARN en facilitant le transfert de proton ou en jouant le rôle d'un acide de Lewis^{32b}.

Les conditions de la Terre primitive contraignent bien sûr les hypothèses qui décrivent les scénarios de l'apparition de la vie. L'une de ces hypothèses propose que la vie ait pu émerger dès l'Hadéen (4,3-3,8 Ga) avec une atmosphère riche en CO₂ produisant un océan acide de pH 3,5 à 6. Une autre proposition suppose que la vie ait apparue au sein des événements alcalins hydrothermaux

(pH 9-11) au fond de la mer, un exemple étant «Lost City ». En effet, l'interface avec l'océan acide pourrait créer un gradient de proton suffisant pour entraîner le premier métabolisme. Cependant

l'ARN est plus stable à un pH de 4 à 5 et il est instable à un pH alcalin, soulevant la possibilité que l'ARN puisse avoir d'abord surgi dans un océan acide (proche des événements hydrothermaux, ...).

En plus de ces conditions, la Terre primitive était dépourvue de couche d'ozone. Par conséquent, les rayonnements UV il y a 4 Ga étaient plus intenses à la surface de la Terre que les rayonnements actuels^{35, 37}.

Ces radiations UV sont considérées comme une source d'énergie plausible pour des synthèses prébiologiques³⁵. D'un autre côté, les UV sont capables de dégrader la plupart des molécules organiques. Ils sont plutôt considérés comme un obstacle majeur à la théorie du monde ARN car ils provoquent une rupture du squelette de pentose-phosphate et aboutissent à la formation de dimères de pyrimidine³⁸. En général, l'irradiation UV des polymères d'ARN pourrait être dommageable pour les bases azotées, le squelette phosphate-sucre et les liaisons glycosidiques. Mais les liaisons éthers dans les squelettes phosphate-ribose sont plus sensibles aux lésions dues aux rayonnements UV que les monomères de bases azotées : les rendements quantiques des endommagements causés par l'irradiation UV à 254 nm sont de l'ordre de 10^{-2} et 10^{-4} respectivement pour des sucres phosphorylés et pour des monomères de bases azotées³⁹. Il semble donc que les bases azotées protègent le squelette phosphate-ribose des rayonnements UV³⁹. En fait, la recherche en exobiologie s'attache à proposer certaines stratégies pour protéger les premières formes de vie, dont l'adsorption sur des surfaces minérales⁴⁰; d'autres recherches ont montré la présence d'absorbants d'UV dans l'atmosphère (H_2S , SO_2 , S_8) et dans les océans (Mg^{2+} , Cl^- , Br^- , Fe^{2+} , SH^-) qui auraient pu contribuer également à protéger les biomolécules de la dégradation⁴¹.

IV. Les nucléotides

IV.1 Structure

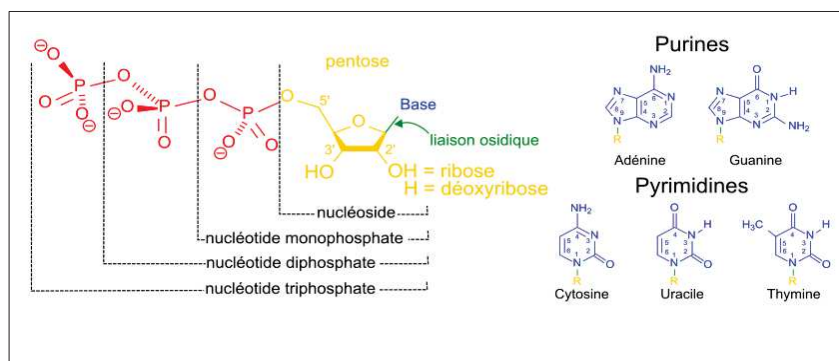


Figure II-8 : La structure des nucléotides.

Comme mentionné dans le §B.II, un nucléotide est formé d'un sucre, d'une base azotée et d'un groupement phosphate. Ces trois sous-structures sont reliées entre elles par des liaisons chimiques ;

formellement, l'obtention de la molécule de nucléotide à partir des trois composantes séparées suppose des réactions de condensation-déshydratation, qui produisent une molécule d'eau par liaison.

Dans un acide nucléique donné, les nucléotides sont caractérisés par le type de base nucléique qu'ils contiennent, puisque les phosphates et les sucres sont toujours les mêmes dans la séquence. Ainsi, une séquence d'un brin d'ARN peut se résumer à la succession des bases nucléiques présentes. Les cinq principaux nucléotides sont nommés selon leur base nucléique. Sur le plan biologique, les nucléotides non polymérisés jouent un rôle central dans le métabolisme. Egalement, ils participent à la signalisation cellulaire et certains d'eux sont des co-facteurs ou co-enzymes des réactions biochimiques. Un exemple de nucléotide très intéressant est l'adénosine triphosphate (ATP). C'est une molécule de stockage de l'énergie libre dans les cellules vivantes, cette énergie se libère par hydrolyse des groupements phosphate.

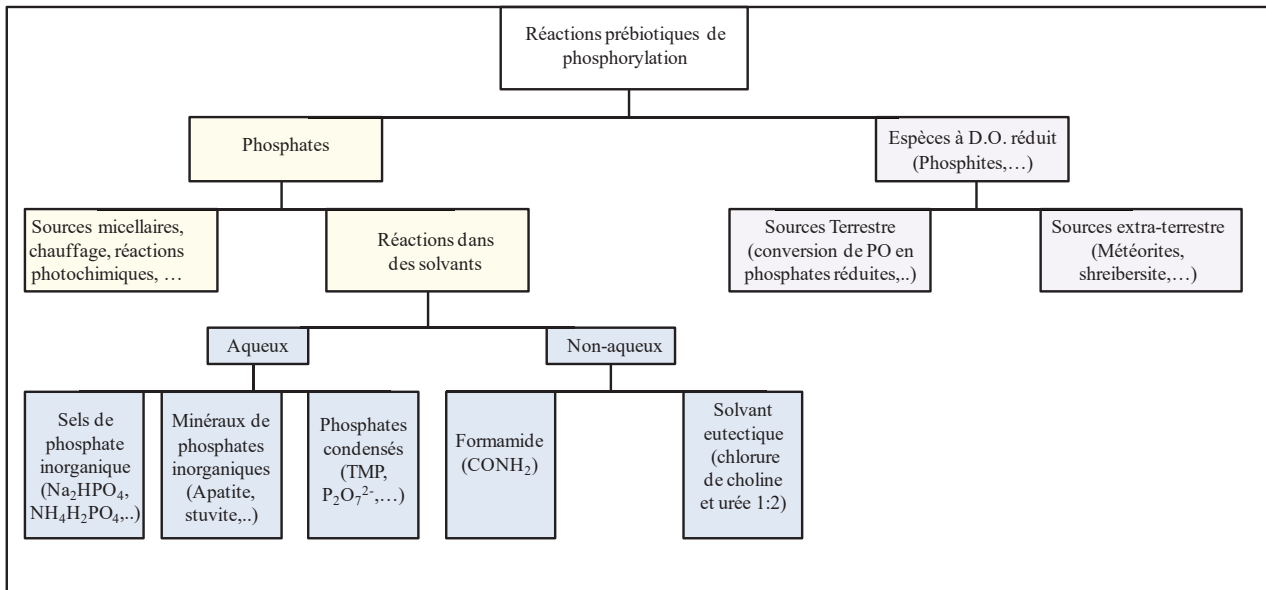
IV.II La phosphorylation dans les conditions primordiales :

L'un des principaux problèmes de la chimie prébiotique est la phosphorylation, c'est à dire l'addition d'un groupement phosphate à une molécule organique. Cette réaction est défavorable thermodynamiquement en milieu aqueux, par exemple :



Conformément à la loi d'action de masse, cette réaction de condensation produit de l'eau et n'est donc pas thermodynamiquement favorisée dans l'eau. Cependant, l'eau est un solvant omniprésent sur la Terre. Sa présence est devenue depuis longtemps synonyme de la recherche de la vie ailleurs. De plus, les scénarios prébiotiques sont principalement décrits et tentés dans l'eau. Alors, comment résoudre le problème thermodynamique dans un environnement géochimique réaliste de la Terre primitive (milieu réducteur, Température élevée...) et chimiquement viable ? Quelles étaient les différentes sources de phosphates ? Quelles sont les réactions de phosphorylation les plus prometteuses ? Quel rôle pourrait être joué par les minéraux vis à vis de ces réactions ?

Dans la bibliographie, les réactions de phosphorylation ont été largement étudiées. La charte ci-dessous présente un schéma générique qui montre les différentes voies de phosphorylation prébiotique décrites jusqu'à présent.

Schéma II-1 : Schéma récapitulatif des différentes réactions de phosphorylation⁴². (Éditée)

i. Les phosphates inorganiques et les polyphosphates :

Afin de surmonter la difficulté d'élimination de l'eau durant la réaction de phosphorylation, différentes conditions ont été employées, telles que l'utilisation d'agents d'activation, le chauffage à haute température, l'utilisation de différentes formes de phosphates ou même l'utilisation d'un solvant non-aqueux, supposé prébiotique.

Les agents d'activation permettent une phosphorylation à basse température avec de bons rendements. Par exemple, le cyanogène (C_2N_2) induit la phosphorylation du glucose-1-phosphate en glucose 1-6 diphosphate avec un rendement de 1-3% à Ta en présence de Na_2HPO_4 ⁴³. D'autres agents d'activation sont couramment utilisés comme la cyanamide, l'imide, l'urée, et le cyanate.

D'autre part, le chauffage de sels d'acide phosphorique en présence des surfaces minérales, par exemple (NaH_2PO_4 -65°C-kaolin)⁴⁴, (H_3PO_4 -100°C-kaolinite+montmorillonite)⁴⁵, ... aboutit à la formation des polyphosphates. Contrairement aux monophosphates, les polyphosphates (TMP⁴⁶, cyclotriphosphate⁴⁷, $Na_4P_2O_7$, $Na_5P_3O_{10}$ ⁴⁸...) sont considérés comme étant d'excellents agents de phosphorylation. Par exemple, le phosphate inorganique adsorbé sur la surface de la silice amorphe se condense en polyphosphates à des températures relativement basses. Dans la même gamme de température, l'AMP adsorbé singulièrement sur la silice subit une réaction de dismutation donnant lieu à des polyphosphates organiques d'intérêt biologique (ADP, ATP)^{30c}. D'autres exemples ont été mentionnés dans la littérature, comme celui présenté dans le figure I-9 ⁴⁸⁻⁴⁹.

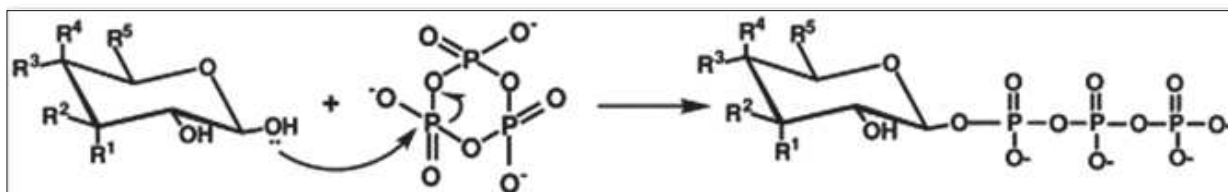


Figure II-9: Le mécanisme de phosphorylation d'un D-aldohexose par un cyclo-triphosphate. ^{49a}

Dans tous ces cas, le problème thermodynamique est résolu simplement par la baisse d'activité de l'eau lors du chauffage à température modérée (séchage), tout comme dans le cas de la condensation des acides aminés. La formation de liaisons anhydride phosphorique P-O-P devient alors thermodynamiquement favorable. Ultérieurement, la fixation du polyphosphate sur une biomolécule se traduit par la formation d'une liaison ester phosphorique (C-O-P) accompagnée de la destruction d'une liaison anhydride phosphorique. Cette réaction est exergonique.

En ce qui concerne l'aspect cinétique, la phosphorylation peut être catalysée par la présence de certains ions ou de leurs sels (Mg^{2+} , Ca^{2+} ...). Une recherche portant sur l'effet de différents ions métalliques sur la formation des nucléotides a montré que le (Mg^{2+}) catalyse la formation de nucléotides 100 fois plus que les autres catalyseurs utilisés⁵⁰. D'autre part, il est bien connu que les ions Mg^{2+} sont capables de former des complexes avec l'ATP et l'ADP permettant leur stabilisation, ce qui est un effet thermodynamique contribuant à la stabilité du nucléotide synthétisé⁵¹. Un autre exemple est celui de borate qui présente les mêmes effets: il stabilise le sucre (ribose) et il catalyse sa phosphorylation⁵².

ii. Les réactions photochimiques

Pendant longtemps, peu d'attention a été consacrée aux voies de synthèse photochimiques. Cela provient du fait que certains chercheurs hésitent à exploiter les défis redoutables de la lumière du soleil. Plus récemment, les rayonnements UV ont été intégrés de plus en plus dans les réactions de synthèse prébiologique. Dans ce contexte, l'acétyl phosphate, une importante molécule biologique phosphatée, a été synthétisé à partir d'une réaction photochimique entre l'acide thio-acétique et le phosphate inorganique en présence de l'uracile et du borax qui ont augmenté la réactivité globale du système⁵³. Une autre réaction photochimique d'intérêt prébiotique est la formation de carbamyl-phosphate à partir du phosphate inorganique et du ferricyanure en utilisant la lumière visible⁵⁴.

iii. Les solvants alternatifs

Comme mentionné auparavant, la phosphorylation dans un milieu aqueux présente un grand défi parce qu'elle implique l'élimination d'une molécule d'eau dans l'eau, « une réaction de séchage dans l'eau ». Pour surmonter ce problème, plusieurs solutions ont été décrites ci-dessus. Nous avons mentionné l'activation thermique qui peut éliminer à l'état gazeux les molécules d'eau formées par

la condensation. Par ailleurs, certains minéraux de phosphate dont les plus pertinents prébiotiquement comme l'apatite, ou la whitlockite, sont difficilement solubles dans l'eau et ne peuvent pas phosphoryler les composés organiques en milieu aqueux. C'est pourquoi l'une des routes alternatives proposées est l'utilisation des solvants non-aqueux comme le formamide⁵⁵. La bibliographie rapporte la phosphorylation de l'adénosine dans un mélange d'eau et de formamide en utilisant le $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ comme source de phosphate. Le mélange a été chauffé à 115°C pendant quelques heures^{22, 55}. Le rendement de phosphorylation du nucléoside dans le formamide va de 6 à 59%, dépendant du type de nucléotides formés⁵⁶. Plusieurs autres systèmes ont été étudiés dans le formamide, en utilisant différentes sources de minéraux phosphates⁵⁷. D'autres solvants ont été aussi utilisés comme le solvant eutectique (urée : chlorure de choline ; 2 : 1)⁵⁸. Notamment, il permet de former des biomolécules mono- di- ou tri-phosphatées après chauffage avec du phosphate inorganique et des composés organiques tels que l'adénosine, l'uridine, le glycérol, ... dans des conditions modérées avec des rendements compris entre 10 et 99%.⁵⁸⁻⁵⁹

iv. Les phosphates réduits

Une autre voie de synthèse des esters phosphoriques est l'utilisation de composés du phosphore réduits, c'est-à-dire avec une valence du phosphore inférieure à +5⁶⁰. Ces composés sont plus solubles dans l'eau⁶⁰⁻⁶¹, on note par exemple : l'acide phosphonique⁶², $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ ⁶³, $(\text{Fe}_2\text{Ni})\text{P}^{64}$, $\text{Fe}_3\text{P}^{64-65}$. On trouve par exemple une réactivité plus intéressante du $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$ par rapport à celle de phosphate d'ammonium dans la phosphorylation de nucléosides⁶³. La formation de composés phosphorylés à partir de ces sources alternatives de phosphore implique au moins une étape redox, contrairement à la condensation avec un groupe phosphate.

IV.III La glycosylation des nucléobases (formation de nucléosides) dans les conditions primordiales :

i. Généralités

La formation des nucléosides pyrimidiques et puriques est l'un des grands débats de la chimie prébiotique. Si l'on part de sucres et de nucléobases préformés, on doit avoir la formation d'une liaison β -glycosidique entre l'atome d'azote de la base nucléique et le carbone anomérique du sucre (ribose ou désoxyribose respectivement dans l'ARN et l'ADN). La réaction paraît simple mais certaines limitations importantes existent et influent sur son orientation. En plus du problème thermodynamique, on a deux autres limitations : la régiosélectivité et la stéréosélectivité. En ce qui concerne la régiosélectivité, les bases puriques hétérocycliques ne sont liées, dans les biomolécules, qu'à l'atome d'azote de la position (N9) alors que les bases pyrimidiques utilisent seulement l'azote

situé en position (N1). A propos de la stéréosélectivité, la liaison glycosidique doit être en configuration β , c'est-à-dire que l'acide nucléique doit être au-dessus du cycle de ribose.

En principe, on a trois voies possibles pour la synthèse des nucléotides qui peuvent répondre à ces exigences. Tout d'abord, si l'on suppose que le nucléoside est obtenu par la condensation de ses deux composants principaux préformés, ces deux molécules doivent interagir directement entre elles via une réaction de déshydratation. Cette voie de synthèse a été largement étudiée dans différentes conditions de pH, température, en présence et absence de certains métaux. Ensuite, on a deux autres voies de synthèse qui se basent sur la construction multi-échelles du squelette. Elles consistent en la formation de l'acide nucléique sur le sucre ou, à l'inverse, la formation du sucre sur la base azotée. Ces trois voies de synthèse sont détaillées ci-dessous :

ii. Glycosylation directe : réaction de déshydratation

Les premières synthèses prébiotiques de nucléosides ont été rapportées par Ponnamperuma, Saga et Mariner (1963)⁶⁶ et par Schramm (1965)⁶⁷. D'abord, Ponnamperuma a affirmé avoir observé la synthèse de l'adénosine et de deoxyadénosine en faible rendement par irradiation UV des solutions diluées d'adénine, de D-ribose et soit de NaCN, de H₃PO₄ ou de métaphosphate d'éthyle. Toutefois, une étude ultérieure de ces réactions a montré que les produits désirés (adénosine et deoxyadénosine) sont obtenus avec des rendements non détectables⁶⁸. Schramm (1964)^{67a} a montré que l'adénosine et ses esters phosphoriques sont obtenus après chauffage de l'adénine et du D-ribose avec des esters de polyphosphates organiques dans des conditions anhydres. Cependant, l'accumulation des polyphosphates organiques sur la terre primitive semble improbable, et par conséquent ces réactions ne peuvent pas être considérées comme prébiotiques⁶⁹. En 1972, Orgel⁷⁰ a décrit la formation des nucléosides puriques par chauffage d'un mélange de bases puriques et du ribose avec du chlorure de magnésium et des phosphates inorganiques (2.3% de β -adénosine). Il a poursuivi l'étude en élargissant la gamme des bases nucléiques (guanine, hypoxanthine) et en utilisant différents sels comme MgSO₄, CaHPO₄, MnCl₂, (NH₄)₂HBO₃, NaCl, CaCl₂ et certains minéraux comme la montmorillonite, la kaolinite et la zéolithe. Un examen attentif de ces études met en évidence l'effet de la présence de sels de magnésium et du phosphate inorganique sur la régiosélectivité de la réaction. Spécifiquement, un simple chauffage d'adénine et de guanine avec du ribose aboutit à la formation de 2-ribosylamino guanine et de 6-ribosylamino adénine. Une légère amélioration de la régiosélectivité a été observée en présence de chlorure de magnésium et du phosphate inorganique avec lesquels on a détecté de la riboadénosine (4%) et de la riboguanosine (9%)⁷¹, figure I-10 .

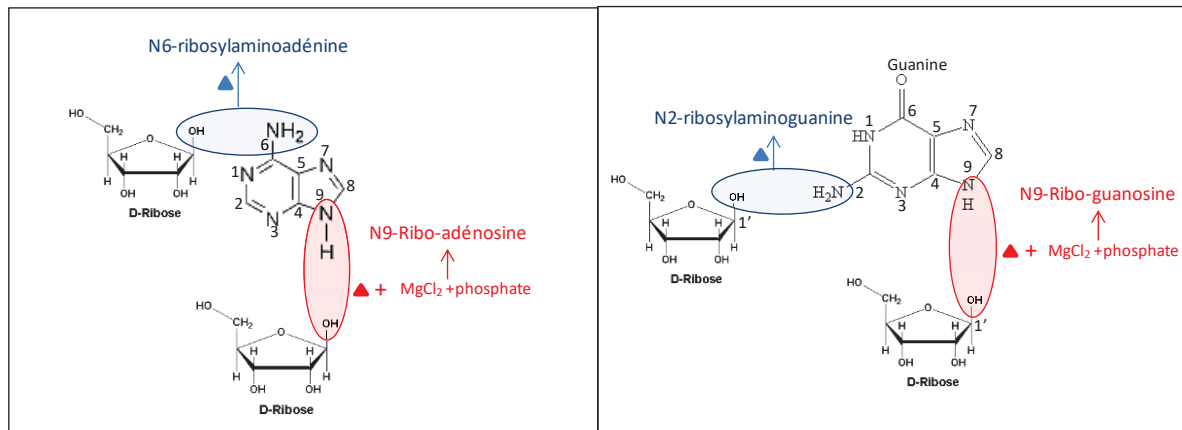


Figure II-10 : les différents sites de glycosylation d'adénine et de guanine après chauffage en présence et en absence de MgCl₂ et de phosphate inorganique.

Cette amélioration de sélectivité proviendrait d'une coordination spécifique de l'atome d'azote des bases nucléiques. D'autres synthèses prébiotiques de nucléosides puriques ont été faites, comme la préparation d'adénosine et de désoxyadénosine à partir de mélanges de sucres et d'adénine et en présence de TiO₂, ZnO, feldspath et schiste⁷² ainsi qu'en présence de phosphates⁷³.

Malgré les travaux réalisés durant les trois dernières décennies, la glycosylation des bases pyrimidiques dans des conditions prébiotiques n'a toujours pas pu être réalisée⁷⁰. C'est pourquoi certains chercheurs (orgel et al) ont décidé d'explorer des voies alternatives aboutissant à la formation prébiotique des nucléosides pyrimidiques, y compris la construction de cytosine sur un groupement de sucre phosphorylé⁷⁴. Cette approche a été poursuivie par l'équipe de J. Sutherland, qui a développé une voie de synthèse pour la cytidine et l'uridine à partir de glycol aldéhyde et de glycéraldéhyde⁷⁵. Mais la nécessité de séparer temporellement les réactifs spécifiques et les étapes réactionnelles a amené à remettre en question la pertinence de cette synthèse à l'origine de l'ARN. Sutherland et ses collègues ont alors proposé un scénario géochimique spatialement séparé²⁶. Ce scénario comprend une "livraison" ordonnée des réactifs sur la Terre primitive qui coïncide avec les étapes successives de la synthèse des nucléotides pyrimidique.

D'autre part et malgré toutes les difficultés rencontrées, Hud a trouvé en 2007 que le séchage et le chauffage d'un mélange de 2-pyrimidinone et de ribose aboutit à la formation d'un ribo-nucléoside « le β-furanosyl (zebularine) » avec un rendement de 12%. D'autres isomères chimiques sont aussi détectés²⁹. En fait, ce travail est considéré comme étant la première synthèse d'un nucléoside pyrimidique par séchage d'un mélange de base nucléique et d'un sucre non activé. Cet auteur a également étudié le rôle catalytique des ions Mg²⁺ sur le mécanisme réactionnel de la glycosylation⁷⁶ et montré la formation d'un β-ribofuranoside de TAP (2,4,6- triamino-pyrimidine) à partir du ribose et du TAP⁷⁷. Enfin, il a pu montrer en 2016 la glycosylation spontanée en milieu aqueux de deux

bases non canoniques, la mélamine et l'acide barbiturique, qui a abouti à la formation de quatre isomères de nucléosides ⁷⁸.

➤ *Mécanisme de glycosylation*

A propos du mécanisme de la glycosylation, il est proposé que le groupement de purine/pyrimidine peut former un complexe non-covalent avec le sucre via la formation d'une liaison hydrogène (figure). Un exemple de modélisation physique⁷⁹ montrant l'interaction entre l'adénine et les deux isomères (α et β) du D-ribose est présenté ci-dessous.

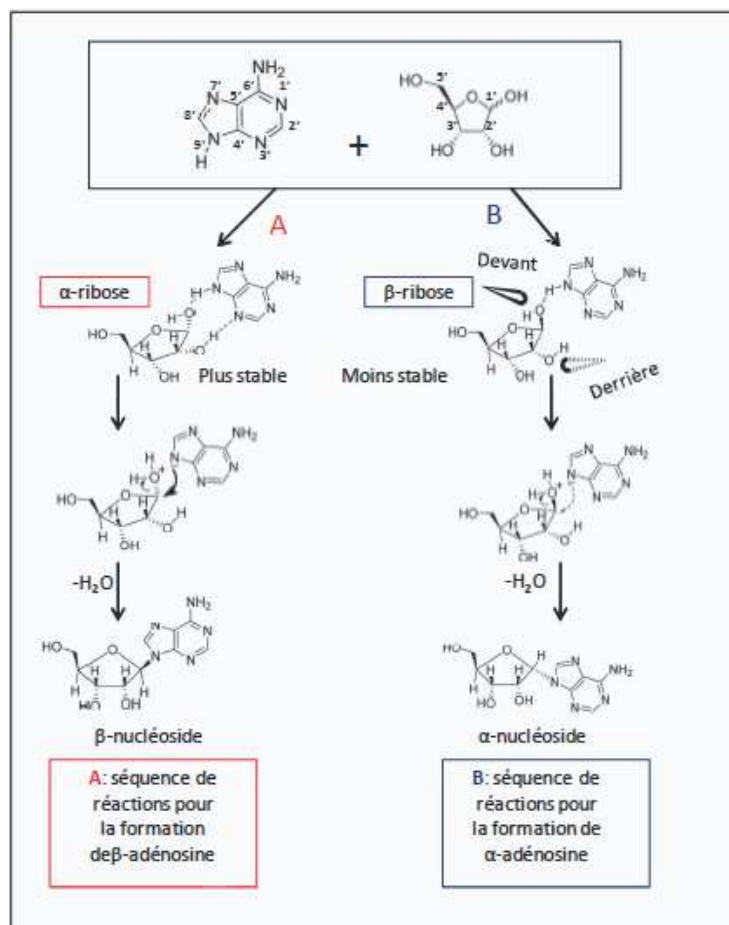


Schéma II-2 : Le mécanisme proposé de la glycosylation des deux anomères α et β ribose par l'adénine.

Comme observé, l'isomère α -D-ribose et l'adénine sont en position favorable pour interagir via des liaisons hydrogène impliquant d'une part le N9-H de l'adénine (donneur) et le C'1-OH du sucre (accepteur), d'autre part le N1 de l'adénine (accepteur) et le C'2-OH du sucre (donneur). En revanche, des limitations géométriques empêchent le β -D-ribose de former des liaisons hydrogène par les deux groupes OH à la fois. Par conséquent, le complexe formé entre l'adénine et le α -D-ribose est plus stable.

La liaison hydrogène évolue en une abstraction du H de N9-H purique par le C'1-OH du sucre, ce qui active l'azote N9 pour une attaque nucléophile sur le C'1 du D-ribose. Enfin, la perte d'une molécule d'eau complète la formation de nucléoside. Etant donné que le β -nucléoside est généré à partir d'un α -D-ribose, et qu'à l'inverse le α -nucléoside est généré à partir d'un β -D-ribose, ce mécanisme aurait pour conséquence que la formation de β -nucléotides est favorisée cinétiquement.

iii. Glycosylation multi-étapes : formation de la base nucléique sur le sucre

Pour éviter la formation directe d'une liaison C-N, une voie alternative pour la synthèse des nucléosides, soutenu par Orgel et Sutherland, aurait d'abord impliqué des précurseurs de sucres activés en tant que plateforme de départ pour initier la construction d'une base nucléique^{74, 80}. Parmi tous les précurseurs hétérocycliques étudiés, les dérivés de l'aminooxazoline ont abouti à des résultats très intéressants en chimie prébiotique⁸¹. En effet, le groupement carbamidique du cycle aminooxazoline favorise différentes réactions de condensation avec formation de bases nucléiques⁸² telles que la cytosine et l'uracile.

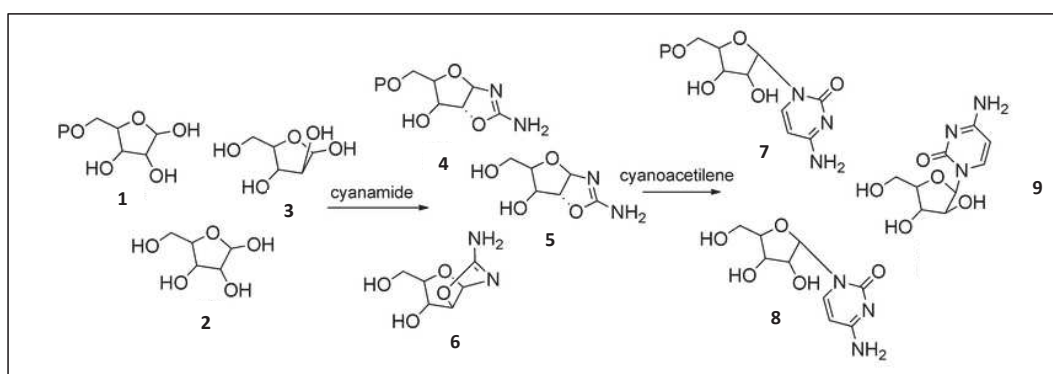


Schéma II-3 : la formation de α -cytidine par synthèse de la base nucléique sur le ribose.

iv. Glycosylation multi-étapes : formation du sucre sur la base nucléique

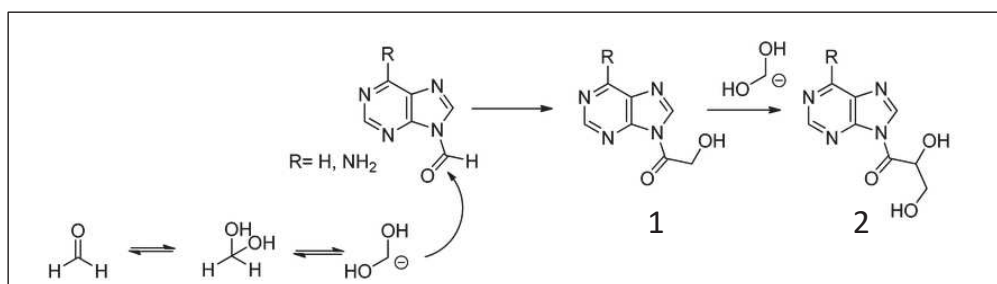


Schéma II-4 : la réaction de formation d'acyclonucléosides à partir de formyl purine.

Alternativement, les nucléosides peuvent être formés par construction du sucre sur une base nucléique convenable et précédemment activée. Le schéma ci-dessus montre un exemple simple de formation de nucléoside à partir de formylpurine. En fait, les bases puriques substituées par un

groupement formyle sont parfois utilisés comme intermédiaires réactionnels dans les réactions de formation de nucléosides⁸³. Ce sont des candidats importants, ils peuvent présenter un intérêt particulier pour la chimie prébiotique, une fois impliqués dans les réactions de synthèse de sucre « formose⁸⁴ ». Durant la glycosylation, le formaldéhyde (HCHO), produit in-situ par dégradation catalysée (par TiO₂) de NH₂CHO, attaque le carbone de la chaîne électrophile latérale de la formyl-purine⁸⁵. Après chaque attaque, une élongation de la chaîne latérale du sucre acyclique est observée ce qui augmente la complexité de la molécule. De cette façon, la chaîne latérale peut atteindre jusqu'à 5 ou 6 atomes de carbones. Les acyclonucléosides obtenus sont des composés bioactifs capables de s'apparier avec des bases d'acides nucléiques par interaction Watson-Crick⁸⁶. Prébiotiquement, leur rôle possible a été discuté du point de vue théorique⁸⁷ et a été évalué expérimentalement dans le cas des acyclonucléosides, dérivés du glycérol, capables de se polymériser après activation comme des dérivés de phosphate⁸⁷.

Une autre voie de synthèse d'acyclonucléosides est décrite dans la bibliographie. Il suffit de chauffer le formamide en présence de certains catalyseurs minéraux. Comme exécuté par Saladino⁸⁵, le chauffage de formamide en présence d'une grande variété de minéraux aboutit à la formation des quatre bases canoniques ainsi que des acyclonucléosides puriques. Compte tenu du caractère plausiblement prébiotique de formamide en tant que matériau de départ et solvant⁸⁸, la synthèse "one-pot" d'un proto-nucléoside est une possibilité très remarquable qui mérite certainement une considération sérieuse.

IV.IV La formation de nucléotides

Si le monde ARN a précédé les formes les plus complexes de la vie, il est nécessaire de déterminer le processus de formation des nucléotides. Compte tenu de la structure modulaire de ces monomères, des chimistes ont supposé depuis longtemps la formation d'abord de leurs briques de bases (bases nucléiques, ribose et phosphates) par trois réactions prébiotiques différentes. Ensuite, leur liaison par une séquence de réactions prébiotique qui va produire les nucléosides, puis les nucléotides⁸⁹. Pourtant, il est nécessaire de trouver une voie de synthèse qui "fonctionne" en conditions prébiotiques.

Non seulement il faut utiliser des produits chimiques et des conditions susceptibles d'avoir été présents au moment de l'origine de la vie, mais si la synthèse se produit en plusieurs étapes il faut que les conditions d'apparition et/ou de stabilité des intermédiaires successifs ne soient pas incompatibles. Pour cela, il est indispensable d'un côté de trouver les réactions de synthèse possibles de ces composés et de déterminer les moyens d'assemblage qui aboutissent à la formation

des nucléotides. D'un autre côté, il faut souligner certaines problématiques générales. Par exemple, en raison de leur grande stabilité, les bases azotées sont susceptibles d'être formées en premier. Elles pourraient persister sans doute, tandis que ces conditions ont évolué de sorte que le ribose puisse être synthétisé. Juste après la synthèse, le ribose doit être protégé d'une façon ou d'une autre de la décomposition⁹⁰. A ce stade, une question importante se pose : le ribose est-il glycosylé par une base nucléique avant ou après sa phosphorylation ? Expérimentalement, les deux possibilités, phosphorylation de nucléoside^{56a, 57, 91} et glycosylation de ribose phosphorylé^{69, 78} ont été étudiées. De plus, la formation de nucléotides à partir de leurs briques de base comprend d'autres barrières comme le lieu et le moment de synthèse, ce qui nécessite d'avoir une étude approfondie et un scénario plus clair. Plus précisément, les bases azotées sont formées à partir de l'HCN alors que le ribose utilise comme précurseur le formaldéhyde. Ces briques de bases (bases azotés, ribose) ne pourraient pas se former dans le même endroit et en même temps parce que leurs précurseurs moléculaires peuvent réagir facilement entre eux pour former des acides aminés. Ce fait aurait diminué leur potentiel de formation des composantes de nucléotides⁹⁰. En fait, la nécessité de séparer temporellement les réactifs et aussi les différentes étapes de la réaction ont attiré l'attention de Sutherland et ses collègues qui ont pu trouver une solution à ce propos. Ils ont proposé un scénario géochimique spatialement séparé qui présente un apport ordonné et successif des réactifs sur la Terre primordiale, tout en respectant les étapes successives de la synthèse des nucléotides²⁶.

La formation du ribose par la réaction formose n'est pas sélective⁹². Sa glycosylation n'est pas efficace dans le cas des bases puriques et elle ne se produit pas du tout avec les bases canoniques pyrimidiques⁶⁹⁻⁷⁰. Pour cela, certains chimistes ont essayé de dépasser ces problèmes en remplaçant ces briques de base par d'autres. Par exemple : la formation des nucléotides pyrimidiques à partir d'intermédiaires d'amino-oxazoline et d'anhydronucléosides⁷⁵. Les difficultés persistantes à trouver une route prébiotique simple et robuste aboutissant à la formation des nucléosides canoniques ont poussé certains chercheurs à considérer l'ARN comme un produit d'évolution chimique ou biologique tardive^{87, 93}. Inspiré par la possibilité que l'ARN ait évolué à partir d'un proto-ARN avec des nucléobases alternatives qui formeraient plus facilement des nucléosides, Miller a pu montrer que l'urazole (analogue de l'uracile) est efficacement glycosylé par le ribose dans l'eau⁹⁴. De plus, des études ultérieures sur la formation des nucléosides à partir de différents analogues prébiotiquement plausibles suggèrent la possibilité d'avoir d'autres nucléosides sur la Terre primordiale^{29, 70}. Récemment, Hud a rapporté un modèle prébiotique de formation de deux nucléosides non canoniques qui s'apparient entre eux et avec leurs partenaires canoniques, en tant que monomères en solution aqueuse⁷⁸.

IV.V Les analogues de nucléotides et la régiosélectivité

Lors d'une condensation non enzymatique du sucre et d'une base, le C1' du ribose peut se retrouver lié à un azote de manière non canonique. En effet, les nucléosides puriques canoniques sont constitués d'un β -D-ribofuranose dont le C1' est lié au N9 de la base purique. Les nucléosides pyrimidiques eux ont des liaisons en C1'-N1.

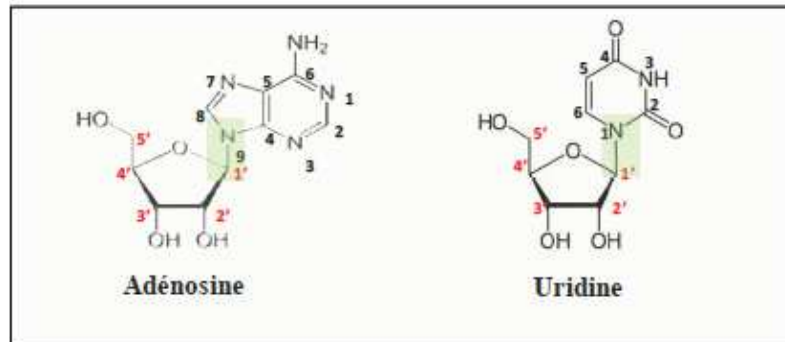


Figure II-11: La liaison glycosidique des nucléosides canoniques.

Plusieurs auteurs ont montré l'existence de ribosylpurines liant le C1' du ribose à un autre N de la base. En effet, les bases canoniques apparaissent moins promptes que certaines bases alternatives à former des liaisons N-glycosidiques conventionnelles⁹⁵. Ainsi on sait que lors d'une condensation non-enzymatique d'une adénine et d'un ribose, le C1' de celui-ci se fixe préférentiellement au N6 de l'adénine⁹⁶. Dans les mêmes conditions l'hypoxanthine, base non canonique, se lie en C1'-N9 avec un meilleur rendement⁹⁶. Toutefois, il semble que la liaison N-glycosidique soit plus résistante dans les nucléosides canoniques (C1'-N9) que dans les analogues. Ainsi, une des hypothèses pour expliquer l'enrichissement en bases canoniques est que la stabilité de la liaison N-glycosidique peut avoir joué un rôle comme pression de sélection, aboutissant aux nucléotides actuels.

Les liaisons C1'-N1 ou C1'-N3 existent également mais on trouve moins de données dans la littérature. Des auteurs ont montré la présence de 3-ribosyl acide urique dans les érythrocytes synthétisés par une nucléotide pyrophosphorylase, enzyme catalysant la condensation de la base et du 5-phosphoribosyl-1PP (PRPP)⁹⁷. En purifiant cette enzyme, les auteurs ont montré qu'elle acceptait également comme substrat la xanthine pour donner du 3-ribosyl xanthine. La liaison N-glycosidique mise en place entre le C1' et le N3 de la base purique est par ailleurs équivalente à la liaison entre le C1' et le N1 d'une pyrimidine.

C. Le ribose

I. Structure

Le ribose est un monosaccharide de la famille des aldopentoses, un ose constitué d'une chaîne de 5 atomes de carbone ainsi que d'une fonction aldéhyde. Sa formule générale est « $C_5H_{10}O_5$ ». Il a été découvert par Phoebus Levene et Walter Abraham Jacobs en 1908 aux États-Unis à New-York. Son nom provient du nom de l'institut où ils travaillaient : le **Rockefeller Institute of Biochemistry**, « ribose »⁹⁸. A l'instar des autres sucres, il est utilisé par les êtres vivants sous la forme D, désignation de la configuration absolue de ses carbones asymétriques selon la représentation de Fischer. L'origine de cette homochiralité est d'ailleurs un point essentiel à étudier pour expliquer les origines de la vie⁹⁹. En solution, il existe sous 4 formes anomériques (α,β -pyranose et α,β -furanose)¹⁰⁰.

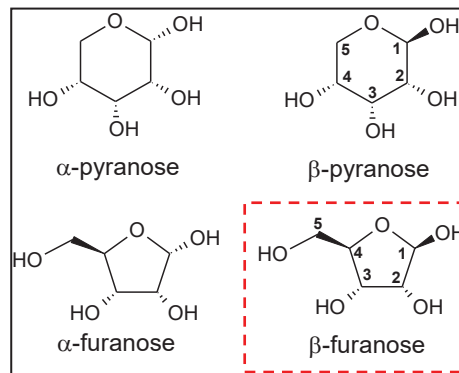
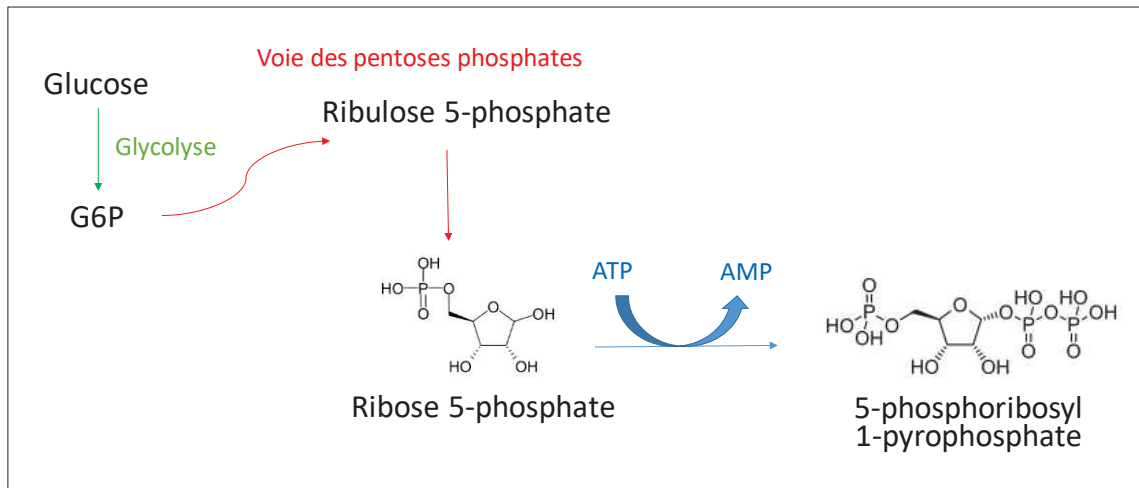


Figure II-12 : les différentes formes anomériques de ribose $\alpha\beta$ -ribofuranose et $\alpha\beta$ -ribopyranose.

Dans les acides nucléiques, le ribose est présent exclusivement sous forme furanose, un cycle à cinq sommets composé de quatre C et un O, avec une anomérie β qui signifie que le groupement hydroxyle en C1' et le CH_2OH lié au C5' sont au-dessus du plan du cycle selon la représentation de Haworth^{100a}.

Comme nous l'avons vu le ribose est l'un des constituants essentiels de l'ARN, mais il est aussi un intermédiaire important dans plusieurs voies métaboliques cellulaires. Il intervient ainsi dans la voie des pentoses phosphates, donnant comme produits le fructose 6-phosphate et le glycéraldéhyde 3-phosphate¹⁰¹. D'autre part, le ribose issu de la voie des pentoses phosphates sert également à la synthèse de novo des nucléotides. Le R5P est pyrophosphorylé par une PRPP (phosphoribosyl pyrophosphate) synthétase utilisant l'ATP¹⁰²:

Schéma II-5 : Le mécanisme de l'AMP (nucléotide) à partir du ribose¹⁰².

➤ Le PRPP, 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate :

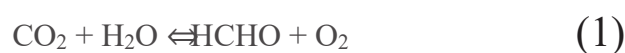
Le PRPP est un ribose activé indispensable à la synthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques. La base azotée est soit créée à part et condensée sur le ribose, dans le cas des pyrimidines, soit assemblée directement sur le ribose, dans le cas des purines. Dans les deux cas, lors de la première étape de la voie de synthèse, la rupture de la liaison phosphoester, libérant le pyrophosphate, fournit l'énergie nécessaire à la formation de la liaison N-glycosidique par laquelle la base est liée au C1' du ribose¹⁰². Le PRPP est donc, dans la biologie actuelle, un intermédiaire important dans la synthèse des nucléotides mais n'a jamais été évoqué expérimentalement pour des réactions en chimie prébiotique.

II. Formation et stabilité

Dans le contexte de la chimie prébiotique, la synthèse du ribose, sa stabilité et sa réactivité sont particulièrement intéressantes surtout pour évaluer l'hypothèse du monde ARN.

II.1 Réaction de formose :

La réaction de formose, «formation des oses », découverte par le chimiste Russe *Alexandre Butlerov* en 1861, consiste principalement à polymériser le formaldéhyde pour former des sucres de C2 à C6 plus ou moins ramifiés²⁸. La source la plus importante de formaldéhyde sur la Terre primitive était la synthèse atmosphérique photochimique (en phase gazeuse). Le formaldéhyde est formé par photo-réduction de CO₂ et d'H₂O (1)¹⁰³:



Le formaldéhyde peut aussi être formé par décharge électrique dans une variété de mélanges de gaz (Miller 1953)¹⁰⁴, par réaction photochimique de CH₄ et/ou CO atmosphérique¹⁰⁵ ou dans des

conditions hydrothermales¹⁰⁶. On a également suggéré une provenance extra-terrestre: les comètes ont pu livrer des quantités importantes de HCHO à la surface de la Terre¹⁰⁷.

La réaction de formose est considérée comme la voie prébiotique de formation des sucres d'intérêt biologique. Théoriquement, cette réaction a pour précurseur unique la molécule de formaldéhyde, qui condense avec elle-même ou avec les produits intermédiaires de la réaction selon le schéma ci-dessous. Tout d'abord, deux molécules de formaldéhyde se condensent pour former le glycolaldéhyde (1) qui réagit ensuite par aldolisation avec le formaldéhyde pour former le glycéraldéhyde (2). Une isomérisation aldose-cétose donne le dihydroxyacétone (3) qui peut réagir avec le glycéraldéhyde pour former le ribulose (4) et par isomérisation le ribose (5). Le dihydroxyacétone peut aussi réagir avec le CH₂OH pour former un céto-térose (6) puis par isomérisation un aldote-térose (7). Enfin, l'aldote-térose peut donner 2 molécules de glycolaldéhyde (1) par rétroaldolisation^{33a}. Certains points de ce mécanisme sont encore imparfaitement compris, ainsi la possibilité de condenser directement le formaldéhyde en glycolaldéhyde a été contestée (A. N. Simonov, O. P. Pestunova, L. G. Matvienko and V. N. Parmon, *Kin. Catal.* **2007**, *48*, 245-254.)

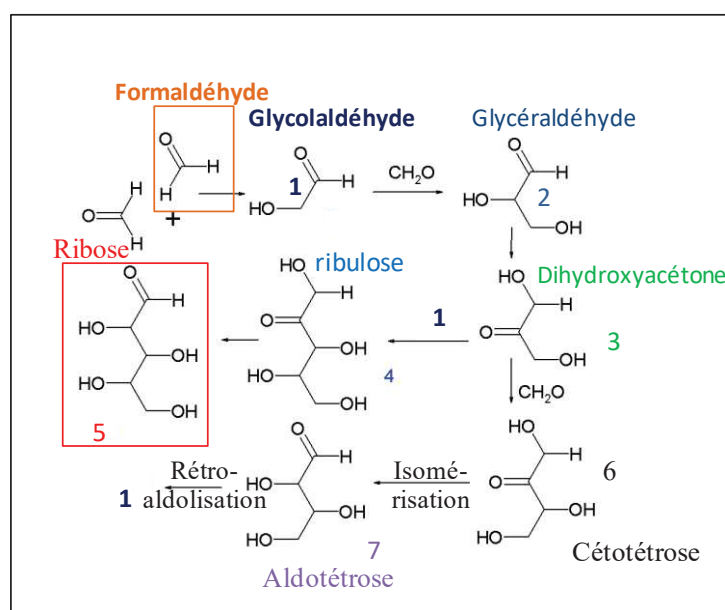


Schéma II-6 : Le mécanisme de formation du ribose par réaction de formose.

La cinétique et les rendements de formation des produits de la réaction de formose sont très sensibles aux conditions expérimentales¹⁰⁸. La réaction se déroule en milieu légèrement basique. Sans catalyseur, la réaction est lente et présente une période de latence. L'hydroxyde de calcium est souvent utilisé comme catalyseur. Il agirait par catalyse basique générale (en tamponnant le milieu), mais peut-être également en formant des complexes avec certains composés intermédiaires¹⁰⁸⁻¹⁰⁹.

II.II La stabilité du Ribose

Le ribose est un produit mineur de la réaction de formose. Une fois formé, il existe sous quatre formes anomères différentes. Comme dans de nombreux scénarios prébiotiques, il existe un problème de sélectivité. Sans même parler de la nécessité d'une énantiosélectivité (la vie utilise exclusivement le D-ribose, en ignorant le L-Ribose), on n'observe que la forme β -furanose dans les nucléotides et les molécules d'ARN. Or, cette forme est minoritaire en solution aqueuse (12%) et n'existe pas à l'état solide¹¹⁰.

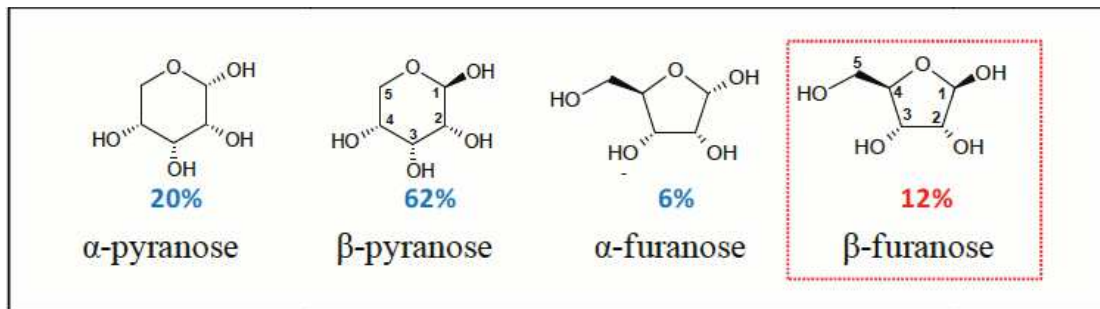


Figure II-13 : Les différents anomères du ribose et leur pourcentage anomérique en solution^{100a}.

En outre, le D-ribose est instable en solution aqueuse. Par exemple, à pH 9 et 60 ° C, sa durée de demi-vie est d'environ 50 h; dans des conditions plus physiologiques, à un pH de 7 et 37 ° C, elle devrait être d'environ 500 h si on se base sur les données de Miller et ses collègues³⁴. Alors, comment ce sucre est-il stabilisé en solution ? Une hypothèse est que les complexes de borates auraient agi comme stabilisateurs du ribose¹¹⁰⁻¹¹¹. De même, au moins deux études ont affirmé que les silicates peuvent stabiliser le ribose en solution lors de la réaction de formose¹¹². Ces complexes résultent de la formation de deux liaisons covalentes entre les atomes d'oxygène des deux groupes -OH de la molécule de ribose et le bore (resp. le silicium). Des études théoriques ont confirmé que le complexe ribose : silicate (2 :1) est plus stable que les autres complexes de pentose et d'hexose. Ce concept est vérifié par *Lambert et al.* et considéré comme étant le premier exemple de sélectivité d'interaction entre un minéral et des sucres¹¹². En outre, les résultats théoriques ont également montré que les complexes de silicate sont exclusivement formés de ribo-furanose parce que, dans cette forme, l'angle dièdre HO-C-C-OH est suffisamment faible pour permettre la formation d'un cycle pentagonal planaire comprenant un atome de silicium¹¹². Donc, le scénario impliquant les silicates pourrait aider à comprendre la sélectivité pour la forme furanose dans l'ARN.

Une autre direction de recherche est basée sur l'interaction des petites molécules biologiques avec les surfaces des matériaux inorganiques. A ce propos notre équipe a récemment prouvé que la surface de la silice amorphe permet de stabiliser le D-ribose durant le séchage, et que de plus elle entraîne une sélection importante de la forme furanose. Plus précisément, les 4 formes anomériques ont été observées après adsorption, et le séchage sous air et sous vide ont augmenté de façon

significative la proportion des formes furanose (resp. 28 et 43%) par rapport au ribose dans la solution (21%)¹¹³.

Les études de sucres en milieu acide sont aussi très importantes, car elles signalent certaines réactions possibles des carbohydrates comme la formation de furfural par ouverture du cycle puis déshydratation. Cette réaction, accompagnée de la perte de trois molécules d'eau par le ribose, a été mise en évidence dès 1943¹¹⁴ (voir schéma). L'effet catalytique des sels métalliques sur la formation de furfural a été également étudié¹¹⁵.

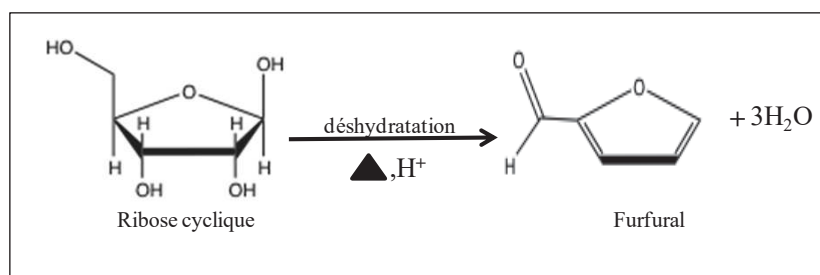


Schéma II-7 : Un mécanisme de formation du furfural à partir de D-ribose.

Des lactones (esters cycliques) peuvent également être formées en milieu acide suivant un processus d'oxydation. D'après la littérature, cette réaction se déroule suivant un mécanisme en trois étapes, comme celui qui est illustré dans le schéma II-8.

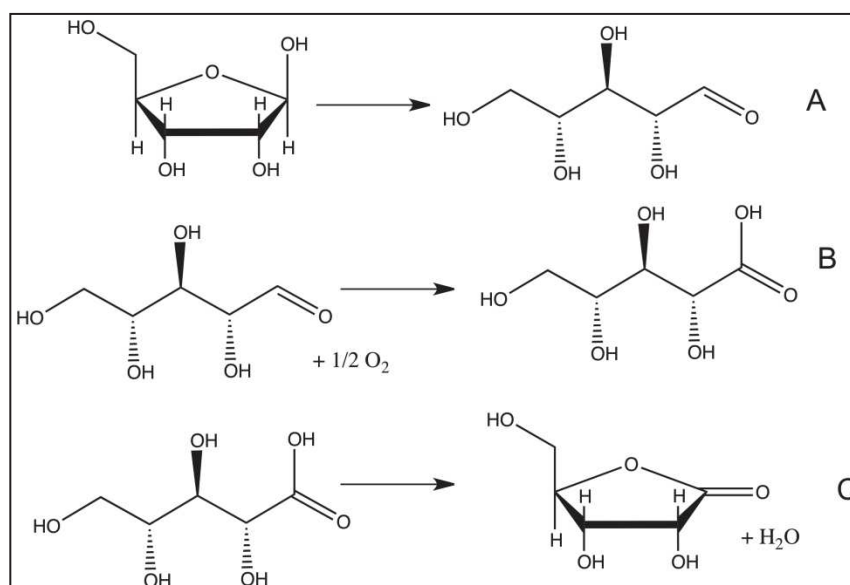


Schéma II-8 : Un mécanisme de trois étapes conduisant à la formation de ribonolactone à partir du D-ribose

Cette réaction débute par la formation du ribose linéaire (A), puis l'oxydation du groupe carbonyle, aboutissant à la formation de l'acide ribonique (B) et enfin la formation de la lactone par déshydratation et recyclisation (C).

III. Techniques de caractérisation

Il est opportun ici de faire le point sur l'apport des principales techniques expérimentales permettant l'étude de la stabilité et de la réactivité du ribose, et plus précisément de celles qui seront appliquées par la suite au ribose déposé sur supports inorganiques.

III.1 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

i. RMN liquide du ^{13}C du Ribose en solution :

La figure I-14 représente le spectre RMN de ^{13}C du ribose en solution dans D_2O . Etant donné la bonne résolution de la RMN à l'état liquide, on distingue clairement les 4 anomères α , β -pyranose et α , β -furanose pour chaque carbone ou presque. Les pics de carbone C1 sont les plus faciles à utiliser pour calculer le rapport anomérique par intégration vu la large séparation de trois des quatre anomères et l'absence d'interférence avec d'autres carbones^{100a, 116}.

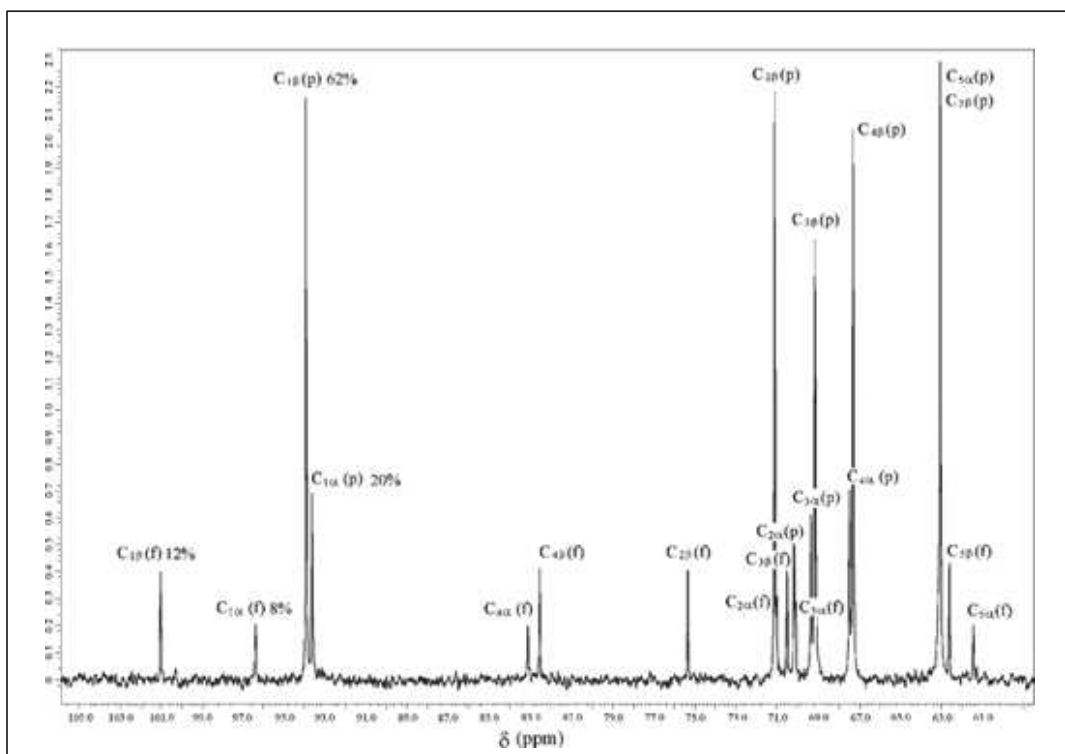


Figure II-14 : Spectre RMN de ^{13}C du ribose en solution aqueuse^{100a}.

Les rapports anomériques sont présentés dans le tableau ci-dessous. La forme pyranose est la forme prédominante. Le pourcentage de β -furanose est de 12% seulement^{100a}, tableau II-1.

Tableau II-1 : Pourcentages anomériques (%) des isomères du ribose en solution aqueuse, calculés à partir des données RMN-région du C1.

isomère	% anomérique
α -pyranose	20%
β -pyranose	62%
α -furanose	6%
β -furanose	12%

ii. RMN solide (MAS) du ^{13}C du ribose massique et du ribose supporté

Le spectre RMN solide du ribose massique (Figure II-15) est assez bien résolu même si les signaux sont, comme on pouvait s'y attendre, nettement plus larges qu'à l'état liquide. La figure montre un spectre obtenu au LRS^{110, 113}, parfaitement compatible avec celui publié par Šišak et al¹¹⁵. On n'observe que deux pics dans la région du C1, à des déplacements proches de ceux des formes pyranose en solution ; l'étude de Šišak, comparant DRX et RMN, permet de confirmer l'attribution des pics à $\delta = 94,9$ et $92,5$ ppm respectivement aux C1 des isomères β p et α p¹¹⁵. On notera au passage que les formes furanose ne sont pas du tout présentes dans le ribose solide massique. Récemment dans notre équipe, des analyses ont été effectuées sur des échantillons de Ribose supporté sur SiO_2 ^{110, 113}; les spectres sont également reproduits en Figure II-15.

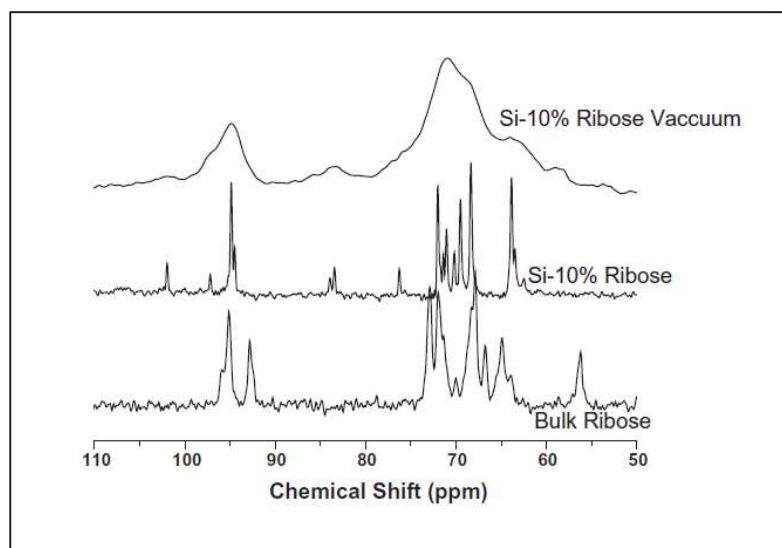


Figure II-15 : RMN ^{13}C -CP-MAS du D-ribose massique, RMN ^{13}C -HPDEC du ribose/ SiO_2 séché à l'air et ^{13}C -CP-MAS du ribose/ SiO_2 séché sous vide¹¹³.

Pour l'échantillon Ribose- SiO_2 séché sous air, les pics sont très fins, plus caractéristiques de l'état liquide que de l'état solide. On a supposé que cet échantillon contient une « solution supportée », où les molécules conservent une grande mobilité. En revanche, l'échantillon de ribose- SiO_2 séché sous vide présente des pics beaucoup plus larges, mais dont les déplacements chimiques peuvent

toujours être attribués aux carbones du ribose. Pour les deux types de séchage utilisés, aucun signal caractéristique de la décyclisation n'est détecté dans la région des carbonyles.

Une décomposition du signal dans la région des pics de C1 a révélé quatre composantes, indiquant la présence des quatre formes anomériques. Le résultat est présenté dans le tableau II-2.

Tableau II-2 : Pourcentages anomériques (%) des isomères du ribose dans l'échantillon 10% Ribose/SiO₂, calculés à partir des données RMN- région du C1.

%	α_p	β_p	α_f	β_f
Ribose en solution aqueuse	19	60	8	13
Ribose liquide, point de fusion	25	46	12	17
Ribose-SiO ₂ séché sous air	13	58	12	16
Ribose-SiO ₂ séché sous vide	9	48	31	12

Dans ce travail, il a été montré une augmentation de la proportion de furanose après adsorption sur la surface de la silice. De 21% (8% α_f , 13% β_f) dans la solution de dépôt, il a augmenté à 28% (12% α_f , 16% β_f) après adsorption sur la silice et séchage sous air. Une augmentation encore plus importante a été observée dans le spectre de l'échantillon séché sous vide¹¹³: 43% de furanose (31% α_f , 12% β_f).

Dans le contexte du monde ARN, ce travail suggère une solution pour deux problèmes principaux. Premièrement, il permet la stabilisation du sucre par adsorption sur la surface de la silice. Deuxièmement, l'adsorption et le séchage augmentent d'une façon significative la proportion des formes furanose par rapport au ribose dans la solution.

III.II Analyse thermogravimétrique (ATG)

i. Ribose massique :

Le thermogramme de l'échantillon de D-ribose massique (figure I-16) montre un événement endothermique sans changement de masse à 90°C, point de fusion du ribose¹¹⁷, suivi par quatre pics de pertes de masse (195° C, environ 20%, endothermique ; 280° C, faiblement exothermique et 320° C, fortement exothermique, 51% pour les deux évènements; 510° C, environ 29% et fortement exothermique, entraînant une combustion complète). On a précédemment attribué l'évènement à 195° C à la polymérisation du ribose, qui s'accompagne de la libération d'une molécule d'eau par ribose; mais en fait la valeur de perte d'eau observée est presque deux fois plus élevée que la valeur attendue¹¹³.

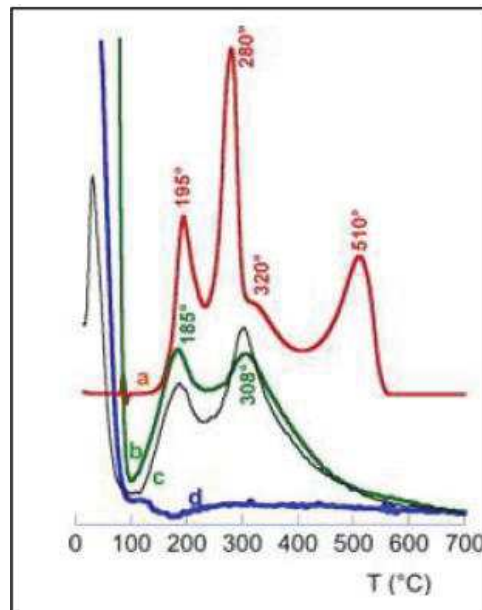


Figure II-16 : DTG (dérivée du signal thermogravimétrique) du ribose massique (a), du 10% ribose/SiO₂ séché à l'air (b), du même séché sous vide (c), du support de silice séché (d)¹¹³.

On a séché une solution de ribose à 70°C, ce qui résulte en la formation d'un gel brun. Celui-ci a été analysé en ATG. Sa TG (non présentée) était totalement différente de celle du ribose, et en particulier n'a pas montré une transition de phase (fusion) à 95 ° C. Ce résultat indique que le processus de séchage avait provoqué d'importantes modifications dans la structure du ribose, ce qui confirme l'instabilité thermique de cette molécule¹¹³.

ii. Ribose/SiO₂

Que le ribose supporté soit séché sous air ou sous vide, il présente le même comportement thermique, mis à part une forte diminution de l'eau physisorbée (manifeste par un pic de désorption à $T \leq 100^\circ\text{C}$) après séchage sous vide¹¹³. Bien que les chercheurs du LRS n'aient pas proposé une interprétation précise du thermogramme du ribose adsorbé, les fortes modifications par rapport au ribose massique indiquant clairement que l'interaction avec la silice modifie la réactivité thermique des molécules de ribose.

III.III Spectroscopie Vibrationnelle (IR) :

Dans la littérature, le ribose massique et le ribose en solution ont été analysés par Raman et FTIR¹¹⁸. Tout d'abord, les spectroscopies vibrationnelles permettent de différencier les différentes formes anomères du ribose cyclique. Par exemple en Raman, la bande caractéristique de $\nu(\text{C-O})$ du ribose massique est observée à 1122 cm^{-1} pour le ribopyranose mais à 1164 cm^{-1} pour le ribofuranose¹¹⁸.

D'autre part, l'évolution de la molécule de ribose (réactivité) dans différentes conditions peut être suivie par IR. La bibliographie fournit des données sur différents dérivés et produits de dégradation du ribose, qu'ils se forment en solution ou à l'état solide, par déshydratation.

Ainsi, à partir des spectres IR, on peut distinguer le ribose linéaire du ribose cyclique. Deux bandes diagnostiques de la forme linéaire, qui résulte de l'ouverture du cycle (Figure II-17), apparaissent à 1723 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$) et 1630 cm^{-1} ($\delta\text{ OH}$)¹¹⁹ et sont caractéristiques respectivement du ribose linéaire et de l'énédiol. Ce dernier est obtenu par isomérisation de la forme linéaire.

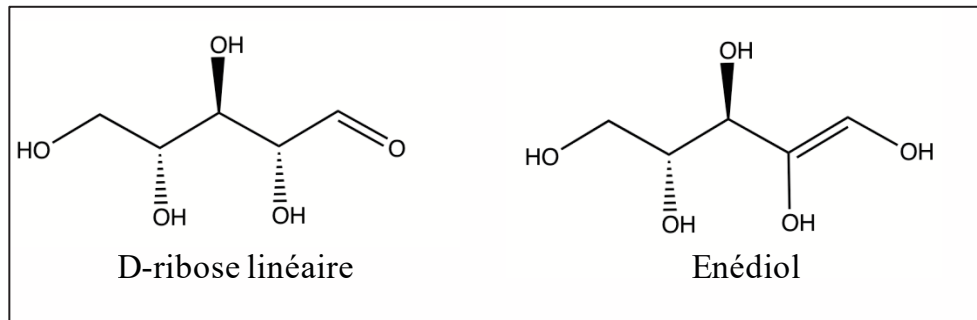


Figure II-17 : Structure moléculaire du D-ribose linéaire et de l'énédiol

En ce qui concerne les dérivés plus profondément modifiés, le furfural et la lactone par exemple sont deux produits qui se forment lors du chauffage du ribose en milieu acide (voir plus haut, schémas I-7 et I-8, § C.II.II): ces deux produits présentent respectivement des bandes caractéristiques à 1715 et 1780 cm^{-1} .

D'autres réactions qui nous concerneront plus particulièrement sont la phosphorylation et la glycosylation. Par spectroscopie IR, la phosphorylation est détectée via la formation d'une liaison C-O-P qui apparaît par exemple à 869 , 715 et 814 cm^{-1} avec le GMP¹²⁰ et à 777 , 815 , 869 et 900 cm^{-1} avec l'AMPNa₂¹²¹. Quant à la glycosylation, elle peut être détectée via la liaison C-N qui par exemple apparaît à 1208 cm^{-1} dans l'adénosine¹²².

Dans un contexte prébiotique, il est important de déterminer les interactions qui peuvent avoir lieu entre le ribose et son environnement, par exemple la complexation de sucres par les métaux présents dans l'océan primitif. Selon le principe de la spectroscopie IR, chaque nombre d'onde est caractéristique d'un groupement fonctionnel bien précis. Pourtant, les interactions des molécules avec leur environnement peuvent être traduites par des déplacements des bandes caractéristiques concernées. A ce propos, plusieurs études IR de la complexation de sucres par les métaux ont été réalisées et peuvent constituer une base de données¹²³.

D. Les bases nucléiques

I. Structure :

Les bases nucléiques ou « nucléobases » sont des composés organiques azotés (bases azotées) hétérocycliques constituant un des composants des acides nucléiques. Les bases principales ou "canoniques" rencontrées dans l'ARN sont au nombre de quatre : deux purines, l'adénine et la guanine, et deux pyrimidines, la cytosine et l'uracile, respectivement symbolisées par **A**, **G**, **C**, **U**. L'uracile est remplacé par la thymine dans l'ADN. Les purines sont des composés bicycliques comprenant deux hétérocycles à cinq et six atomes tandis que les pyrimidines sont des composés monocycliques comprenant un hétérocycle à six atomes.

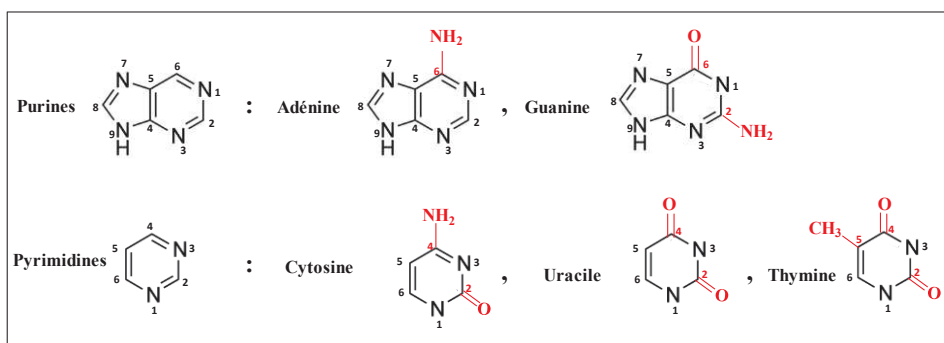


Figure II-18 : Structure des différentes bases nucléiques canoniques ; Adénine, guanine, cytosine, uracile et thymine.

Ces nucléobases se trouvent sous forme de nucléotides dans les acides nucléiques. Dans l'ADN, elles s'apparient au moyen de liaisons hydrogènes pour maintenir la structure en double hélice. Une base purique s'apparie avec une base pyrimidique : l'adénosine avec la cytosine et la guanine avec l'uracile ou la thymine. Il existe par ailleurs d'autres bases, dites bases non canoniques, qui n'entrent pas dans la constitution des acides nucléiques.

II. Formation et stabilité

II.1 La Formation des bases nucléiques sur la Terre primordiale

La littérature rapporte que les bases nucléiques peuvent être synthétisées à partir d'un précurseur simple, l'acide cyanhydrique. Elles peuvent aussi se former à partir de formaldéhyde en présence de différents catalyseurs minéraux comme les silicates ou les argiles. D'autre part, des purines et des pyrimidines ont été trouvées dans les météorites, par exemple dans la météorite de Murchison, tombée en 1969 en Australie.

i. La synthèse des nucléobases à partir d'HCN

Depuis l'expérience fondamentale de Miller sur la synthèse prébiotique des acides aminés, l'attention a été concentrée sur l'HCN comme un potentiel précurseur chimique des acides nucléiques.

➤ *Synthèse à partir des monomères d'HCN*

La première synthèse décrite dans ce contexte est la formation d'adénine par chauffage d'une solution d'acide cyanhydrique (1 à 15 M) dans de l'ammoniaque pendant un à plusieurs jours à des températures modérées (27° à 100°C)¹²⁴. La guanine a été également produite par la polymérisation de solutions concentrées de cyanure d'ammonium (NH₄CN). Cette synthèse a été produite dans la gamme de température comprise entre +20 °C et -80 °C sur une longue période (des mois, voire des années) avec des rendements de 10 à 40 fois inférieurs à ceux de l'adénine. Cette réaction nécessite des concentrations élevées de NH₄CN, qui peuvent sans doute être obtenues dans des environnements glacés de la Terre primitive, à des satellites glacées (Europe, satellite de Jupiter) ou dans des météorites (Murchison)¹²⁵. D'autres synthèses ont été aussi rapportées par la bibliographie¹²⁶.

➤ *Synthèse à partir des oligomères d'HCN*

Les oligomères d'HCN ont pu jouer un rôle très important vis-à-vis de la chimie prébiotique. Ces oligomères, aussi connus en tant qu'acides azulmiques ou azulmins, sont des composés de différents degrés de polymérisation. Ils ont largement diffusés dans l'Univers et ont été associés à la matière noire (dark matter) dans des astéroïdes, des lunes, des comètes¹²⁷...

D'autre part, l'HCN peut se polymériser spontanément, dans certaines conditions terrestres¹²⁸. Les oligomères d'HCN sont d'importantes biomolécules et sont considérés comme des précurseurs de bases nucléiques. Par exemple, l'ébullition de ces oligomères dans une solution d'HCl (6,0 N) produit de l'adénine, le 5 hydroxy-uracile, 4-amino-imidazole-5-carboxamide, 4,5-dihydroxypyrimidine¹²⁹. D'autres synthèses ont été aussi effectuées à partir de ces précurseurs d'oligo-HCN¹³⁰.

➤ *Le cas de la cytosine et de la thymine :*

La cytosine et la thymine n'ont jamais été obtenues avec des rendements appréciables. Cependant, la présence de certains dérivés pyrimidiques en quantités élevées suggère que les premiers matériaux génétiques permettaient l'appariement de bases non standard²². D'autre part, la cytosine peut être préparée à partir de précurseurs chimiques plus complexes que l'HCN, par exemple à partir de

cyanoacétylène ($\text{H-C}\equiv\text{C-C}\equiv\text{N}$) et de cyanate (NCO^-) à 30°C ²². D'autres voies de synthèses sont aussi rapportées dans la littérature¹³¹.

ii. La synthèse des nucléobases à partir de Formamide

Plus récemment, on a démontré que toutes les bases puriques et pyrimidiniques peuvent être synthétisées simultanément à partir de formamide (NH_2CHO)^{22, 132}. On connaît donc maintenant deux voies de synthèse alternatives basées respectivement sur la chimie de HCN et celle de (NH_2CHO) qui aboutissent à la formation des nucléobases. Le rôle potentiel joué par les minéraux a été étudié dans le second cas. En fait, l'activité et la sélectivité pour la synthèse de bases nucléiques à partir de formamide peuvent être finement contrôlées par le choix des minéraux qui fonctionnent alors en tant que catalyseurs hétérogènes, mimant ainsi un véritable environnement prébiotique²². A noter qu'en absence des minéraux, un simple chauffage de formamide à 160°C produit une faible quantité de purine qui en présence d'HCN aboutit à la formation des traces d'adénine.¹³³ Cependant, il a été montré que les minéraux peuvent agir sur ces réactions en tant que catalyseurs hétérogènes :

➤ *En présence d'argiles*

L'implication des argiles dans la chimie prébiotique a été proposée depuis longtemps¹³⁴. Les argiles auraient pu concentrer les précurseurs chimiques présents dans l'environnement prébiotique, participant ainsi à la formation des biomolécules mais aussi à leur protection de la dégradation chimique et photochimique¹³⁵. Il a été rapporté qu'un simple chauffage de formamide en présence de montmorillonite, dans différentes conditions chimiques, aboutit à la formation d'une large variété de produits y compris l'adénine, l'hypoxanthine, le 5 formamidoimidazole-4-carboxamide, la cytosine et l'uracile¹³⁶.

➤ *En présence d'oxydes métalliques*

D'une manière similaire à celle des argiles, les oxydes métalliques, tels que le (SiO_2), l'alumine (Al_2O_3) et le dioxyde de titane (TiO_2) sont capable d'adsorber les biomolécules à partir du milieu aqueux et par la suite de favoriser leur polymérisation^{30e, f}.

En ce qui concerne la formation des bases nucléiques, il a été montré que le SiO_2 et l' Al_2O_3 catalysent à la fois la condensation thermique de formaldéhyde en purines tel que l'adénine, la cytosine, et le 4(3H)- pyrimidinone¹³⁷. De plus, des purines tels que l'adénine, la cytosine, la thymine, le 5-hydroxyméthyl uracile (5-HMU) et d'autres ont été détectées après chauffage de formaldéhyde à 160°C en présence de TiO_2 ⁸⁵.

En outre, l'irradiation UV peut aussi entrer en jeu. Une irradiation UV de (NH₂CHO) en présence de TiO₂ sous vide ou dans un milieu sec aboutit à la formation principale de l'hypoxanthine, avec de faibles rendements d'adénine, cytosine, uracile, thymine et guanine¹³⁸.

➤ *En présence des silicates et des phosphates*

Les silicates et les phosphates catalysent également la synthèse des bases nucléiques à partir de formaldéhyde. Par exemple, la condensation thermique de formaldéhyde en présence de fayalite (FeSiO₄), d'olivine (MgFeSiO₄) et de forstérite (MgSiO₄) aboutit à la formation de cytosine, uracile et 4 (3H)-pyrimidinone en plus des purines simples et d'urée. Cette réaction a montré une efficacité plus grande en présence d'analogues de poussières cosmiques (Cosmic Dust Analogues, CDA) et d'olivines¹³⁹.

Il faut noter que les minéraux de phosphates ont pu jouer un double rôle sur la Terre primitive. Ils peuvent non seulement agir comme catalyseurs, mais aussi comme réactifs de certaines réactions. Par exemple, le phosphate inorganique¹⁴⁰ et l'acide phosphorique¹⁴¹ ont été utilisés pour phosphoryler les nucléosides en milieu aqueux. En même temps, une large gamme de phosphates comme Na₅P₃O₉, Na₄P₂O₇, la libethenite [Cu²⁺₂(PO₄)(OH)], la vivianite [Fe²⁺₃(PO₄)₂(H₂O)₈] et d'autres catalysent la condensation de formamide en bases nucléiques comme l'adénine, l'hypoxanthine, l'uracile, la cytosine¹⁴²...

II.II La stabilité des bases nucléiques sur la Terre primordiale

Les acides nucléiques sont sélectivement formés à partir des cinq bases principales, aussi appelées alphabet génétique. L'analyse des météorites¹⁴³ montre la présence non seulement des cinq bases principales sur la Terre primitive mais aussi d'autres bases. De plus, les bases puriques et pyrimidiques sont connues pour subir des réactions chimiques qui ont pu contribuer à enrichir la diversité de la population. Par exemples, l'oxydation¹⁴⁴ via Fe²⁺ et H₂O₂ en C2 ou C8 des purines et C5 des pyrimidines, ou la substitution électrophile¹⁴⁵ en C5 des pyrimidines pourraient avoir augmenté cette diversité.

Les conditions prébiotiques présentes lors de la formation des bases canoniques peuvent être un facteur de sélection très important. A titre d'exemple, l'irradiation UV et l'hydrolyse sont deux facteurs puissants qui auraient pu probablement compromettre la présence des nucléobases sur la Terre primordiale.

Les groupes amines des bases nucléiques sont sensibles à la désamination. Cette réaction est spontanée. Elle consiste à remplacer un groupement NH₂ par un groupement carbonyle, ce qui peut

conduire à des mutations génétiques¹⁴⁶. Cependant, dans les conditions prébiotiques, il est possible que les bases canoniques aient été plus robustes et stables vis-à-vis de la désamination en milieu aqueux. De nombreux travaux ont étudié la stabilité des nucléobases dans différentes conditions¹⁴⁷. Parmi ces travaux, rappelons les études de Stanley Miller sur les vitesses de réaction de désamination et d'ouverture de cycle car elles fournissent des indices sur la stabilité des principaux hétérocycles. Le tableau III-3 présente les temps de demi-vie des bases canoniques à pH 7 et 100 °C.^{147a, 148}

Tableau II-3 : Valeurs de demi-vie pour la désamination hydrolytique et l'ouverture de cycle (dégradation) à pH 7 et 100°C^{97a, 98}.

Désamination	Demi-vie	Ouverture de cycle	Demi-vie
Adénine	1 année	Thymine	56 ans
Guanine	0.8 année	Uracile	12 ans
Cytosine	19 jours		

D'autre part, l'irradiation UV a été historiquement considérée comme force motrice de la chimie prébiotique et paramètre de sélection des molécules photostables¹⁴⁹. Les nucléobases sont de forts chromophores, elles absorbent dans la gamme d'ultraviolet comprise entre 230-280 nm¹⁵⁰. Par conséquent, les bases canoniques ne sont pas inertes photochimiquement. L'une des réactions les plus importantes est la photodimérisation des résidus d'uracile ou de la thymine dans l'ARN et l'ADN¹⁵¹. Cependant, les nucléobases libres présentent une photo-stabilité exceptionnelle par rapport aux autres hétérocycles¹⁵⁰.

En plus de ces deux facteurs, hydrolyse et irradiation UV, Miller a aussi étudié la stabilité thermique des nucléobases^{148b}. Il a trouvé que leurs durées de demi-vie de décomposition sont très courtes à l'échelle géologique. Par exemple, à 100°C (température de croissance des hyperthermophiles), les durées de demi-vie sont sans doute trop courtes pour avoir permis une accumulation suffisante de ces composés ($t_{1/2}$ pour A et G : 1 an ; U : 12 ans et C : 19 jours)^{148b}. On en déduit que l'origine de la vie ne peut pas impliquer l'adénine, l'uracile, la guanine et la cytosine à haute température. Cependant, à 0°C les nucléobases (A, U, G et T) semblent être suffisamment stables ($t_{1/2} = 10^6$ ans) pour pouvoir s'accumuler. D'autre part, l'insuffisante stabilité de la cytosine ($t_{1/2} = 17000$ ans) suggère la possibilité que la paire GC n'a pas été utilisée par le premier matériel génétique sauf si la vie est apparue rapidement ($<10^6$ ans) après la stérilisation^{148b}.

Revenant aux conditions de la Terre primordiale, le pH de l'océan primitif était plutôt acide (entre 4,5 et 6). Or le pH du milieu réactionnel est un facteur important qui peut affecter la stabilité et la

réactivité des molécules organiques. Prenant par exemple la cytosine, la moins stable parmi les 4 nucléobases^{148b}, sa vitesse de dégradation est presque constante et correspond à un maximum de stabilité dans la gamme de pH comprise entre 4,5 et 9^{32c}. En dehors de cette gamme, c'est-à-dire à un pH < 4,5 ou > 9, cette vitesse de dégradation augmente. Plus précisément, à pH = 3,5 et 10, les durées de demi-vie sont respectivement 132 et 143 ans alors qu'à des pH de 5,4, 6,7 et 8 la durée de demi-vie est de 324 ans^{32c}. Des tendances similaires ont été observées avec l'adénine et la guanine^{148b} mais avec des durées de demi-vie plus longue.

III. Techniques de caractérisation :

Plusieurs méthodes de caractérisation ont été utilisées pour analyser les bases nucléiques. Par exemple la résonance magnétique nucléaire (RMN)¹⁵², la spectroscopie infrarouge (FTIR-Raman)^{122, 153}, la spectroscopie de masse (SM)¹⁵⁴. Deux de ces méthodes sont détaillées ci-dessous :

III.I Résonance magnétique nucléaire (RMN) :

Tous les noyaux des hétérocycles des nucléobases peuvent être analysés par RMN solide ou liquide, à savoir l'oxygène (¹⁸O RMN)¹⁵⁵, l'azote (¹⁵N RMN)¹⁵⁶, le carbone (¹³C RMN)^{152a} et le proton (¹H RMN)¹⁵⁷. Cette technique permet donc d'identifier les différents types de nucléobases et leurs dérivés à partir de leurs déplacements chimiques caractéristiques¹⁵⁸. Par exemple le H8 de l'adénine résonne à 8,1 ppm tandis qu'il est à 8,3 ppm avec l'adénosine et 8,0 ppm avec la 9-méthyladénine¹⁵⁹.

La stabilité des nucléobases peut être aussi analysée par cette technique: la dégradation de la molécule ou l'ouverture de cycle ainsi que la désamination se traduisent directement par un changement du spectre RMN¹⁶⁰. De plus, l'utilisation des noyaux marqués permet de suivre les sites cibles de la molécule lors de l'analyse RMN¹⁵⁵⁻¹⁵⁶.

D'autre part, la RMN 2D donne des informations supplémentaires par rapport à la RMN 1D. Elle permet d'analyser des interactions ou des relations de proximité dans l'espace (through-space) ou à travers des liaisons (through-bond) entre deux noyaux actifs en RMN¹⁶¹. Ce type d'analyse est intéressant surtout pour étudier la formation des nucléosides et nucléotides à partir des nucléobases.

III.II La spectroscopie infrarouge (FTIR et Raman) :

La spectroscopie infrarouge vibrationnelle paraît efficace pour différencier des molécules complexes. En effet, l'analyse FTIR et Raman des nucléobases et de leurs dérivés à l'état solide et en solution aqueuse a été rapportée dans la littérature^{30c, 121-122, 153a, 162}. Par exemple l'adénosine, l'AMP, l'ADP et l'ATP sont tous des dérivés de l'adénine mais peuvent se distinguer entre elles en IR à partir de bandes vibrationnelles caractéristiques^{30c, 121-122, 153a, 162a, b}. Spécifiquement, la bande

vibrationnelle qui différencie l'adénine de l'adénosine est assez diagnostique. Dans l'adénine, les résonances de ν (C=C) et (C=N) apparaissent en une seule bande à 1606 cm^{-1} . Dans l'adénosine, la fixation d'un groupe ribosyle sur l'azote N9 de l'adénine stabilise la structure de la purine et par la suite les vibrations de ces deux doubles liaisons deviennent bien résolues¹²², la ν (C=C) étant observée à 1573 cm^{-1} . Une deuxième bande caractéristique de la glycosylation est celle de la liaison glycosidique, δ N9-C1'-H1'. Elle apparaît à 1055 cm^{-1} après glycosylation en même temps que disparaît une autre bande à 1510 cm^{-1} caractéristique de δ (N9-H) de l'adénine¹²².

E. Les phosphates :

I. Les différentes sources de phosphates sur la Terre primordiale

Le phosphore (P) est un élément essentiel pour la vie, il constitue 1% du poids sec des cellules⁶⁰, et 3% de la composition atomique de l'ARN^{60, 163}. D'autre part, presque 44% des composés métaboliques sont des composés biologiques phosphatés¹⁶³. Il se trouve dans les êtres vivants sous forme de phosphate, omniprésent dans la biochimie, et impliqué dans des liaisons C-O-P, C-P ou P-O-P. La synthèse prébiotique des composés contenant du phosphore tels que les nucléotides nécessiterait à la fois une source de phosphate géologiquement plausible et des voies d'incorporation dans les systèmes chimiques primitifs. A noter que l'importance du phosphore dans la chimie prébiotique et particulièrement dans l'origine des composés biologiques est un concept ancien puisqu'il est déjà mentionné par Darwin¹⁶⁴. A ce propos, plusieurs questions clés de la chimie prébiotique du phosphore sont l'objet de réflexions très actuelles, par exemple : Quelles sont les sources de phosphates les plus probables sur la Terre primitive ? Est-ce que les météorites ont délivré des phosphates ? Est-ce que toutes les sources de phosphates étaient disponibles pour l'incorporation biologique ?

1.1 Les sources de phosphates inorganiques

Différentes formes de minéraux de phosphate peuvent avoir joué un rôle dans l'origine des composés biologiques phosphatés sur la Terre primitive¹⁶⁵. Les premières phases minérales contenant du phosphore dans les chondrites, des météorites, étaient la **schreibersite** (Fe,Ni)₃P^{62, 65}, la **perryite** (Ni,Fe)₅(Si,P)₂¹⁶⁶ et la **merrillite** Ca₉NaMg(PO₄)₇^{165, 167}.

La **brushite** (CaHPO₄.2H₂O) pourrait avoir précipité dans les océans primitifs¹⁶⁸, et dans des conditions de concentrations relativement élevées en magnésium et ammoniac, un précipité supplémentaire devient possible, la **struvite** (MgNH₄PO₄.6H₂O)¹⁶⁹ (cependant cette dernière possibilité est encore discutée¹⁷⁰). Ces deux minéraux peuvent générer des phosphates condensés lors du chauffage¹⁷¹. D'autre part, les minéraux de phosphate dominants incluent l'**apatite**

($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})$), la **whitlockite** ($\text{Ca}_9(\text{MgFe})(\text{PO}_4)_6\text{PO}_3\text{OH}$) et la brushite¹⁷². Ces minéraux sont peu solubles dans l'eau et montrent très peu de réactivité envers les composés organiques^{61, 168, 171, 173}. Or, la concentration d'orthophosphate en solution dépend de la solubilité des minéraux contenant cet ion. Cependant, Orgel a montré que l'hydroxyapatite peut être une source de phosphate pour la phosphorylation en phase solide de nucléosides en présence de chlorure d'ammonium et d'urée¹⁷⁴. D'autres synthèses ont été effectuées par le même auteur en utilisant l'apatite comme source de phosphate¹⁷⁵.

Le phosphore est lithophile dans les conditions d'oxydo-réduction actuelles de la surface de la Terre. Par conséquent, l'orthophosphate est actuellement la forme dominante du phosphate inorganique présent sur Terre. La concentration d'orthophosphate dans l'eau dépend de la solubilité des minéraux d'orthophosphates dont l'apatite, dans les conditions actuelles sur Terre.¹⁷⁶

I.II Les sources de phosphate d'état d'oxydation réduit

L'apparition de décharges électriques dans les nuages d'éruption volcanique est un phénomène familier aux volcanologues¹⁷⁷. De point de vue de la chimie prébiotique, il existe deux caractéristiques intéressantes dans cet événement :

- La présence de gaz réduits dans les éruptions volcaniques
- La présence d'abondantes poussières dans ces nuages

Il a été rapporté que ces conditions étaient adéquates pour des synthèses prébiotiques tel que l'expérience de Miller; d'autre part, un certain nombre de composés organiques, y compris les acides aminés, ont été identifiés dans les dépôts volcaniques¹⁷⁸. De plus, des conditions comme celles décrites précédemment soulèvent la possibilité d'une réduction du phosphate (PO_4^{3-}) en phosphite (HPO_3^{2-}). Schwartz et ses collègues ont simulé le processus et ils ont constaté que la réduction est étonnamment efficace mais dépend fortement de la nature réductrice du mélange gazeux employé¹⁷⁹ (figure II-19).

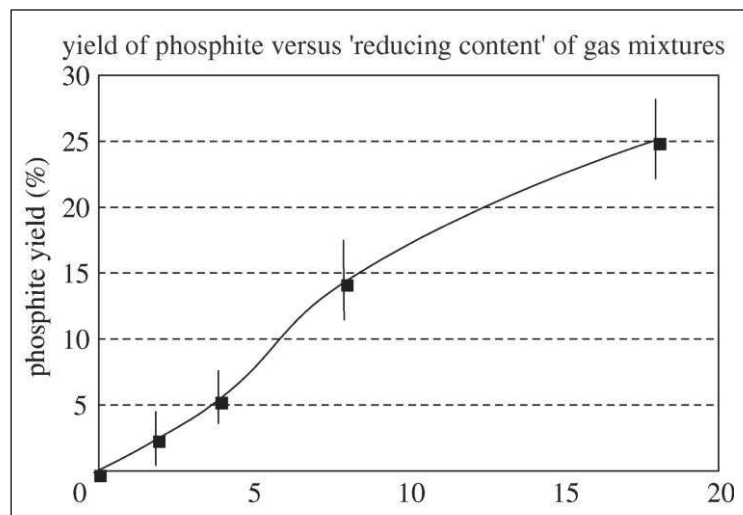
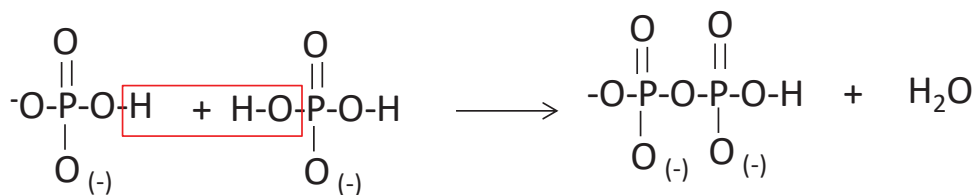


Figure II-19 : La conversion d'apatite en phosphite par décharge d'étincelle dans une atmosphère modèle contenant initialement 60% de CO₂ et 40% N₂, mais avec des additions croissantes de H₂ et de CO (l'abscisse représente la somme des teneurs de H₂ et de CO, présents en concentrations égales). Les points de données (carrés pleins) sont des moyennes de trois à cinq analyses répétées et les lignes verticales indiquent l'écart moyen de la moyenne de chaque série de mesures¹⁷¹.

Le phosphite présente un double intérêt prébiotique. D'abord, son sel de calcium est beaucoup plus soluble que l'apatite (environ 1000 fois plus)^{60-61, 180}. Il a également une grande réactivité, il est utilisé en tant qu'agent de phosphorylation⁶³. D'ailleurs, le phosphite est à la base de la présence des acides phosphoniques dans les chondrites carbonées¹⁸¹, ces derniers sont les seuls composés organiques contenant du phosphore identifiables dans les météorites⁶².

II. Les polyphosphates : source et paramètre thermodynamique de formation

Les polyphosphates sont des polymères oxyanioniques formés à partir de motifs de PO₄²⁻ liés entre eux par des liaisons P-O-P (anhydride phosphorique) comme présenté dans l'équation (II-2) Ces polymères peuvent adopter des structures linéaires (Na₄P₂O₇, Na₅P₃O₁₀) ou cycliques (TMP ou cyclo-triphosphate ...).



Équation II-2 : la réaction de condensation d'orthophosphates

Les polyphosphates sont vitaux dans le monde biologique. Ils sont à la base de la polymérisation des nucléotides à travers la formation de liaisons phosphodiester et des molécules prébiotiques telles que le phosphoribosylpyrophosphates (PRPP) ou le trimétaphosphate. Ces derniers pourraient être des intermédiaires réactionnels dans la formation des nucléotides, principalement puriques. Sur la Terre primitive, ils auraient pu constituer des agents de phosphorylation efficaces puisqu'ils constituent des molécules déjà activées.

En phase solide, la réaction de condensation de monophosphates peut se faire par activation thermique, mais celle-ci ne peut pas être issue des processus volcaniques, impliquant des températures trop élevées, qui aboutiraient à la formation de verres phosphatés. Un article paru dans *Nature* en 1991 montre cependant expérimentalement la formation de polyphosphates linéaires et cycliques à travers la condensation de gaz volcaniques riche en P₄O₁₀¹⁸². Cette molécule présente l'avantage d'être thermodynamiquement stable jusqu'à 1000 °C. Sa formation est néanmoins spéculative et serait liée à la réaction entre autres du phosphore gazeux et du CO₂ de l'atmosphère. D'autres tentatives de condensation de phosphate par activation thermique ont été faites. La synthèse de métaphosphates par chauffage de dihydrogénophosphates et celle de pyrophosphates par

chauffage de monohydrogénophosphate sont connues depuis longtemps : elles ont été observées entre 200 et 600°C dans des systèmes ouverts. Pourtant, il existe deux problèmes : les minéraux de dihydrogénophosphate ne sont pas connus dans la nature et le chauffage à des températures élevées dans un système ouvert provoque la dégradation des molécules organiques présents dans le milieu. D'autre part, les tentatives de formation de polyphosphates à basse température ont eu très peu de succès, à l'exception de la formation de métaphosphate d'ammonium à partir de dihydrogénophosphate d'ammonium à 60-100°C. Rappelons que le dihydrogénophosphate d'ammonium est prébiotiquement ambigu. Plus récemment, notre équipe a montré la condensation de phosphate inorganique par adsorption sur la surface de la silice amorphe et activation thermique modérée. La silice a un effet catalytique sur la réaction de condensation: alors que la formation des polyphosphates à partir de KH_2PO_4 commence à 200°C avec une condensation quantitative vers 320°C¹⁸³ seulement, le même phosphate inorganique adsorbé sur la silice amorphe est quantitativement condensé à une température plus faible (200°C).

Une autre source potentielle de composés phosphoreux réactifs a été suggéré par Pasek et Laurretta en 2005⁶⁴: le phosphore contenu dans les minéraux de schreibersite (météorite). Selon leur travail, la solubilisation de Fe_3P synthétique avec de l'eau pure ainsi qu'avec une solution saline produit rapidement des phosphates condensés ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) ainsi que l'hypophosphate ($\text{P}_2\text{O}_6^{4-}$), composé contenant une liaison P-P. Les auteurs supposent que l'hypophosphate peut être un précurseur de pyrophosphate.

De façon générale, il n'y a pas de preuves géochimiques de la présence ancienne de polyphosphates. Le seul exemple de roches polyphosphatées a été trouvé aux Etats Unis sous forme de pyrophosphates de calcium.

III. Techniques de caractérisation :

III.1 Résonance magnétique nucléaire :

L'analyse par RMN de ^{31}P permet de déterminer la nature des molécules contenant du phosphore ainsi que leurs interactions avec le milieu. Tout d'abord, la RMN de ^{31}P du monophosphate (orthophosphate) en solution aqueuse montre une relation entre le déplacement chimique et le pH de milieu^{30c, 184}. Son signal se trouve à +0,3 ppm lorsque l' H_2PO_4^- est prédominant et se décale vers les champs faibles (déplacements chimiques élevés) avec l'augmentation du pH, pour arriver à +3,0 ppm dans la gamme de prédominance d' HPO_4^{2-} . Les phosphates cycliques ne sont par contre que légèrement affectés par le changement de pH¹⁸⁴.

A l'état solide, le spectre de ^{31}P RMN du phosphate massique KH_2PO_4 présente un signal à 4,1 ppm, soit un shift de +3,8 ppm par rapport à H_2PO_4^- en solution^{30c}. Ce shift a été attribué à l'influence des

interactions intramoléculaires (ex : liaisons hydrogènes) présentes dans la phase cristalline. On voit donc que les liaisons intermoléculaires ont une influence aussi importante sur le signal RMN que l'état de protonation des oxygènes portés par le phosphore.

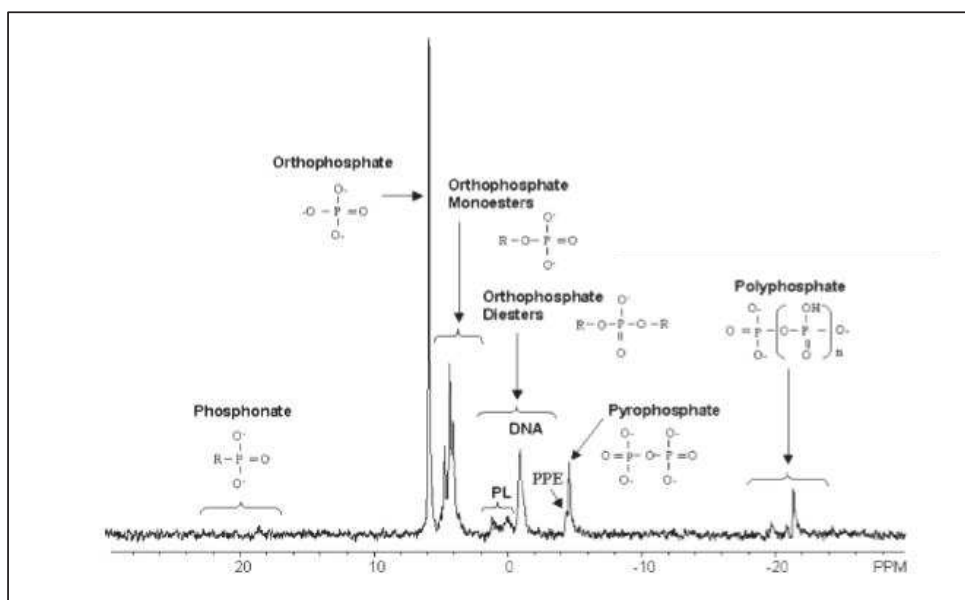


Figure II-20 : ^{31}P RMN liquide d'un échantillon de sol de forêt extrait par NaOH-EDTA¹⁸⁵.

Mais des effets plus importants sont observés lorsque les phosphates sont condensés, formant des liaisons P-O-P. Dans ces espèces condensées, la première sphère de coordination du phosphore contient toujours quatre oxygènes, mais la seconde sphère de coordination peut contenir 1, 2 (voire 3) atomes de P, comme le montre la figure II-21¹⁸⁵.

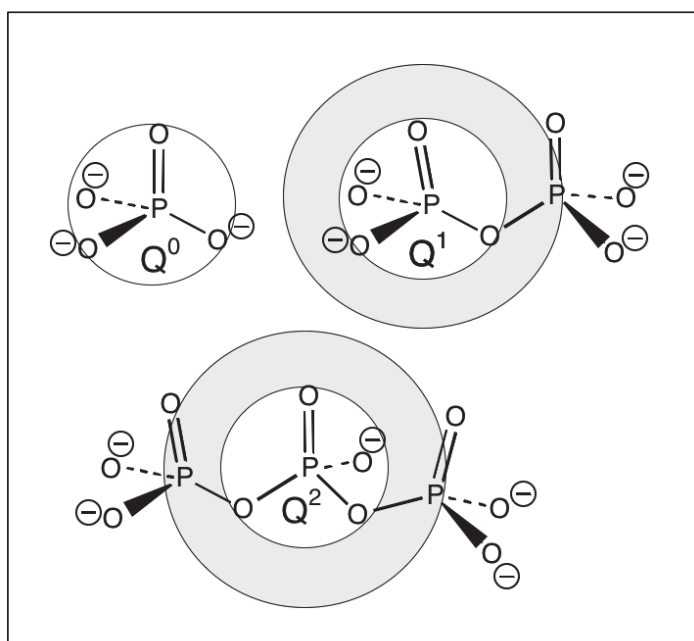


Figure II-21 : Les environnements Q^0 , Q^1 et Q^2 dans les polyphosphates. Noter qu'un monophosphate contient uniquement des Q^0 , un diphosphate uniquement des Q^1 , un triphosphate à la fois des Q^0 et des Q^1 .

Ces environnements différents peuvent être indiqués par les abréviations Q^0 , Q^1 , Q^2 (éventuellement Q^3), comme dans la chimie du silicium. Les résonances correspondantes sont séparées d'une dizaine de ppm: les signaux des Q^0 se trouvent entre +4 et -2 ppm, ceux des Q^1 entre -2 et -13 ppm, ceux des Q^2 entre -13 et -25 ppm. Lorsque les trois environnements coexistent, les trois massifs correspondants sont généralement bien séparés, comme par exemple dans les spectres de la Figure II-22.

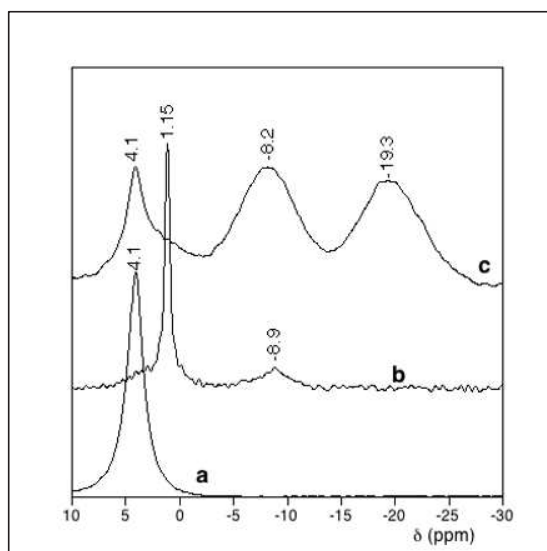


Figure II-22 : RMN du solide ^{31}P – séquence one pulse : a. KH_2PO_4 ; b. 5 % $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{SiO}_2$; c. 5 % $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{SiO}_2$ après activation thermique à 160 °C sous vide.^{30c}

La position de résonance du phosphore est aussi diagnostique de son environnement dans les molécules organiques phosphorylées, où la seconde sphère de coordination peut contenir des liaisons P-O-C (ester phosphorique) aussi bien que P-O-P. Par exemple on peut différencier le ribose-5'phosphate de l'AMP (adénosine mono-phosphate), de l'ADP (adénosine diphosphate) et de l'ATP (adénosine triphosphate). Le tableau ci-dessous présente les différents déplacements chimiques obtenu par analyse en RMN de phosphore¹⁸⁶.

Tableau II-4 : les déplacements chimiques obtenus en ^{31}P RMN de R5'P, AMP, ADP et ATP.

Composé	$\delta(\text{ppm})$
Ribose-5-phosphate	3,86
Adénosine-5'-monophosphate	3,75
Adénosine-diphosphate	α -10,61
	β -6,11
Adénosine tri-phosphate	α -10,92
	β -21,45
	γ -5,80

Des expériences RMN plus complexes peuvent fournir des renseignements sur la spéciation chimique: le degré de protonation de phosphates ainsi que leurs interactions avec le milieu ont été analysés par RMN 2D par exemple (^{31}P , ^1H)¹⁸⁷.

Dans notre équipe, la réactivité du phosphate adsorbé sur la surface de la silice a déjà été étudiée par RMN de ^{31}P . La présence de KH_2PO_4 solide se traduit par un signal à + 4,1 ppm. Un simple séchage à 70°C de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{SiO}_2$ ne permet pas la déshydratation complète ; il en résulte une "solution solide supportée" concentrée contenant du monophosphate dans un état de protonation intermédiaire (signal fin, + 1,15 ppm) et en quantités moindres du diphosphate (-8,9 ppm). Après activation thermique à 160°C, on observe trois signaux larges correspondant à des espèces peu mobiles d'environnement Q^0 (+1,5 ppm), Q^1 (-8,2 ppm) et Q^2 (-19,3 ppm). Ces espèces peu mobiles correspondraient à des monophosphates et à des polyphosphates adsorbés, interagissant avec des groupes de surface de la silice.^{30c}

III.II Analyse thermogravimétrique :

Le thermogramme du KH_2PO_4 massique (Figure II-23, courbe noire) a été discuté à plusieurs reprises dans la littérature^{30c, 183}. En fait, la perte de masse totale dans cette région (13,3% du poids initial) correspond à une déshydratation totale par condensation des groupes P-OH des dihydrogénophosphates, aboutissant à l'apparition de " KPO_3 " (sans doute un trimétaphosphate en fait). Le profil de l'évènement thermique correspondant est complexe, pour des raisons qui ne nous concernent pas ici^{30c}.

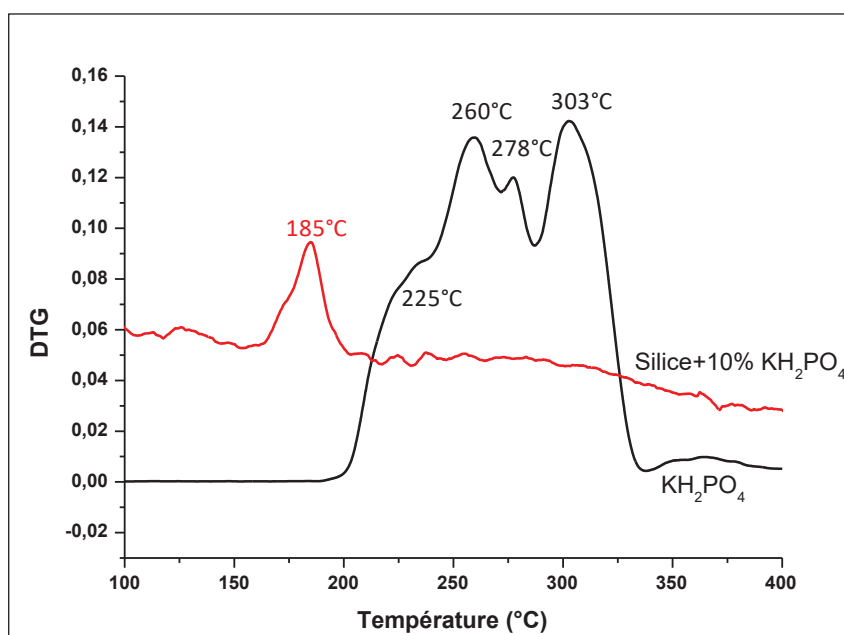


Figure II-23 : DTG de l'échantillon de phosphates adsorbés sur la silice (rouge) et de l'échantillon de phosphates cristallin KH_2PO_4 (noire).^{30c}

Le profil de TG obtenu après adsorption de phosphate inorganique sur la surface de la silice est différent de celui du phosphate massique. Pour 10% $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{SiO}_2$ (Figure II-23, courbe rouge), il ne montre qu'un seul pic détectable à 185°C associé à un événement endothermique, soit une température significativement inférieure à celle observé avec le phosphate massique. Cet événement pourrait correspondre à une condensation des groupes P-OH du phosphate; la quantification montre que la perte de masse qui lui est associée correspond à un degré de polymérisation intermédiaire entre diphosphate et trimétaphosphate.^{30c}

III.III Diffraction des rayons X

Les phosphates cristallins ont été largement analysés par DRX. Comme tous les composés cristallins, ils ont leurs diffractogrammes caractéristiques qui permettent de les identifier dans un échantillon contenant plusieurs phases. Ainsi, lorsqu'on dépose une solution de KH_2PO_4 sur SiO_2 , les pics fins de KH_2PO_4 massique n'apparaissent qu'au-delà d'une certaine charge massique : la DRX permet donc de détecter la fraction de phosphate précipitée dans le milieu et par là d'estimer la quantité de phosphate maximale qu'on peut adsorber sur une surface minérale.

III.IV Spectroscopie infrarouge

Les spectroscopies infrarouge et Raman sont d'excellentes méthodes pour l'analyse des unités de PO_4 dans différents environnements puisque le nombre et la position des bandes P-O dans le spectre dépendent de la structure cristalline et notamment de la symétrie de l'environnement. De nombreuses études Raman de phosphates de potassium et sodium ont été publiées. Deux régions de spectre sont intéressantes, la région $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ (vibrations d'élongation des O-H) et la région $600\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ (vibrations d'élongation P-O)^{183, 188}.

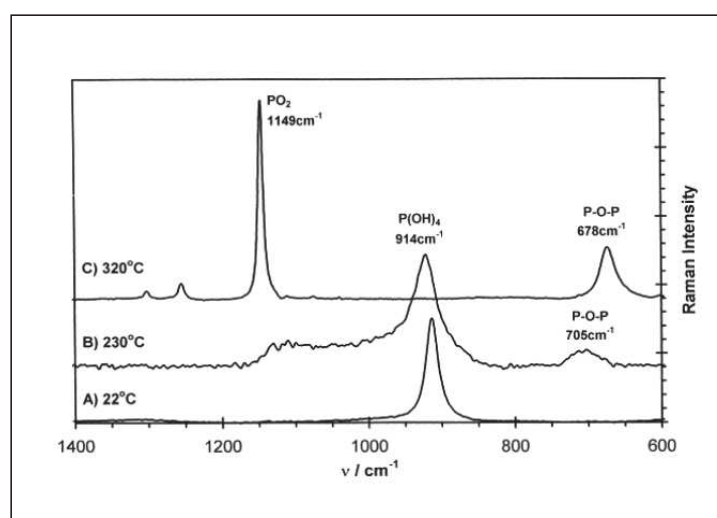


Figure II-24: Spectre Raman de KH_2PO_4 à 22°C (A), 230°C (B) et 320°C (C)¹⁸³.

Le spectre Raman de KH_2PO_4 est présenté dans la figure II-24. Cette spectroscopie permet de distinguer les monophosphates des polyphosphates. En effet, le spectre de KH_2PO_4 affiche une seule bande à 914 cm^{-1} , qui correspond à un ensemble de vibrations symétriques comme dans $\text{P}(\text{OH})_4$. Cette observation est en accord avec la structure tétragonale du cristal, dans lequel chaque tétraèdre PO_4 est lié via des liaisons hydrogène à quatre autres. Les spectres enregistrés à des températures supérieures à 230°C reflètent la perte d'eau observée par ailleurs en TG (voire partie E.III.i). Pendant que l'eau est extraite de la structure cristalline, la vibration d'étirement de $\text{P}(\text{OH})_4$ à 914 cm^{-1} est remplacé par une vibration d'étirement des PO_2 de polyphosphates à 1149 cm^{-1} , accompagnée d'une large bande à 705 cm^{-1} caractéristique de la liaison P-O-P. A une température encore plus élevée (320°C), la bande caractéristique des monophosphates (914 cm^{-1}) disparaît totalement du spectre. En même temps, le déplacement de la bande caractéristique des vibrations P-O vers des nombres d'onde plus élevés est une indication de l'augmentation de la force de liaison dans les polymères formés entre les atomes d'oxygène et les atomes terminaux de phosphore, par rapport à $\text{P}(\text{OH})_4$. En revanche, la bande P-O-P observée à 705 cm^{-1} se déplace vers 670 cm^{-1} ce qui indique la diminution de la force de liaison due à la réaction de polymérisation.

Sur base des spectres Raman, une distinction entre mono- et polyphosphates est donc possible. Notons que la condensation de KH_2PO_4 a lieu sans passage par des intermédiaires réactionnels stables et détectables¹⁸³.

F. Surfaces minérales

I. Apports par rapport au travail en solution

L'influence des surfaces minérales en chimie prébiotique a été vérifiée de nombreuses fois. En tant que sites de concentrations de composés organiques¹³, ces surfaces pourraient avoir joué un rôle à la fois important et simple dans l'évolution prébiotique. En effet, les espèces dissoutes dans l'océan primitif sont concentrées sur des surfaces minérales par adsorption.

Or une synthèse prébiotique en phase liquide, probablement donc en milieu dilué, a des chances limitées d'être réalisée, parce que la plupart de ces réactions, correspondant à une augmentation de complexité, impliquent la condensation entre deux réactifs. Ceci a été énoncé par Bernal en 1951. Statistiquement, les réactifs ont peu de chance de se rencontrer et cet effet déplace l'équilibre vers la gauche. Donc, l'hypothèse d'apparition de la vie dans un océan primitif paraît irréaliste. Des conditions particulières et cohérentes avec un environnement prébiotique doivent donc être imaginées afin de rendre favorable les réactions de polymérisation de ces molécules : l'adsorption fournirait un tel scénario.

Les mécanismes d'adsorption peuvent être imputés à diverses formes d'interactions, covalentes, ioniques, électrostatiques, de van der Waals, voir solvophobe... L'adsorption peut induire une sélectivité significative, entre molécules apparentées, ou entre isomères d'une même molécule. Par exemple, il a été montré que le ribose pouvait être stabilisé dans sa configuration furanose par adsorption sur la surface de la silice amorphe¹¹³. Il s'agit d'un résultat intéressant pouvant expliquer un stockage de ce sucre avant sa condensation avec des bases azotées.

Par ailleurs, les minéraux peuvent être des catalyseurs pour une variété de réactions prébiotiques potentiellement importantes¹⁸⁹. Cependant, il ne faut pas oublier que les catalyseurs activent des réactions thermodynamiquement favorables mais cinétiquement inhibés, par diminution de la barrière énergétique: ils accélèrent l'approche de l'équilibre mais ne changent pas l'équilibre final. A titre d'exemple, l'influence de surfaces minérales sur la polymérisation de monomères, acides aminés et nucléotides adsorbés a été étudiée. L'expérience de James Ferris et Leslie Orgel fait référence dans ce domaine^{31a}. Ils ont obtenu des peptides à partir d'acides aminés activés, à l'interface d'argile, illite, ou d'hydroxylapatite, minéral de la famille des phosphates. Ils ont également montré que la polymérisation de nucléotides activés était possible à l'interface d'une argile, la montmorillonite. Des polymères de 55 nucléotides ont ainsi été obtenus sans l'intervention d'enzyme. Dans ce dernier cas, l'effet catalytique est clair mais il n'est pas démontré que l'adsorption sur les surfaces ait un effet thermodynamique puisque la force motrice était fournie de toute façon par l'activation chimique des monomères.

Les surfaces minérales peuvent aussi catalyser d'autres réactions, dont la formation des briques élémentaires de l'acide nucléique. Par exemple, Saladino et ses collègues ont montré les effets de différentes surfaces minérales comme le sulfure de fer, la montmorillonite et le rutile sur la formation de certains hétérocycles azotés présents dans l'ARN^{85, 136, 139, 190}.

Plusieurs propositions ont été avancées aussi sur la participation des surfaces minérales dans des réactions stœchiométriques irréversibles qui pourraient avoir contribué à la chimie prébiotique¹⁹¹. Par exemple, la schreibersite ((Fe, Ni)₃P) est proposée comme source stœchiométrique de composé organique phosphorylé et phosphonylé sur la terre primitive⁶⁴. Le minéral est ici un réactif et non un catalyseur.

D'autre part, la biochimie est remarquable par sa préférence d'utiliser une seule forme énantiomérique d'une paire donnée, par exemple exclusivement le D-ribose et les L-acides aminés. L'origine de cette chiralité a attiré beaucoup d'attention dans ce domaine. Depuis les travaux pionniers de Louis Pasteur, il est connu que les cristaux de minéraux peuvent exister sous différentes formes chirales, et les différentes formes d'un minéral peuvent être asymétriques. Globalement, les surfaces minérales peuvent présenter des environnements intéressants pour la sélection chirale¹⁹¹.

Par exemple, les monomères de nucléotides activés peuvent former de préférence des oligomères homochiraux lors de leur polymérisation sur une montmorillonite homoionique¹⁹².

II. La silice amorphe

II.I Choix de la silice amorphe vis-à-vis de la chimie prébiotique

La silice amorphe était présente sur la Terre primitive sous forme de cherts. Sur le plan géochimique, ces roches hautement siliceuses (>75%) ont permis de préserver les plus anciens organismes primitifs jusqu'à ce jour-là. Cette préservation en a fait des cibles scientifiques majeures pour l'étude des conditions environnementales qui ont vu l'apparition de la vie sur Terre.

Sur le plan expérimental, il existe plusieurs résultats encourageants sur l'interaction des biomolécules prébiotiques avec la silice. D'abord, le ribose est stabilisé en solution par les silicates^{84b, 112, 193}. D'autre part, Georgelin et al ont montré sa stabilisation dans la configuration furanose sur la surface de la silice amorphe¹¹³. De plus, il a été montré que les acides aminés déposés sur la silice peuvent être polymérisés en oligopeptides par activation thermique modérée^{30b}. Dans des conditions similaires, il a été montré la condensation de phosphates inorganiques en polyphosphates^{30c}.

II.II Les cherts :

Les cherts sont présentes en abondance dans l'ensemble des cratons archéens. Elles permettent de contraindre les environnements primitifs qui ont vu l'apparition de la vie sur Terre¹⁹⁴.

Ces roches siliceuses se forment selon trois processus¹⁹⁴ :

- 1) Les **C-cherts** (cherts primaires) se forment par précipitation chimique de silice océanique sur le plancher, sous la forme d'une boue siliceuse ou en tant que ciment dans les sédiments de surface.
- 2) Les **F-cherts** (cherts de fracture) précipitent dans les fractures de la croûte depuis les fluides circulant.
- 3) Les **S-cherts** (cherts secondaires) sont issus de la silicification de roches préexistantes lors de la percolation de fluides enrichis en silice.

La formation massive de cherts à l'Archéen présente alors la réponse de l'environnement aux concentrations océaniques excessives de silice (absence des organismes à test siliceux).

La composition chimique et isotopique de ces roches est largement utilisée pour retrouver, entre autres, la température¹⁹⁵ et les caractéristiques géochimiques des océans archéens¹⁹⁶ ; une approche

basée sur le postulat que les cherts sont effectivement capables de retenir la composition chimique des fluides dont ils sont issus.

D'autre part, l'intérêt des cherts ne se limite pas aux processus océaniques et s'étend à la fois aux processus hydrothermaux et circulations fluides dans la croûte^{195d, 196a} et aux processus d'altération à la surface des continents¹⁹⁷ en lien étroit avec les conditions climatiques et atmosphériques^{195a, b}.

II.III La structure de la silice amorphe

La structure générale de SiO_2 est neutre. Dans le volume interne, chaque atome d'oxygène est le pont entre deux tétraèdres $[\text{SiO}_4]$, de sorte que le rapport silicium : oxygène est de 1 :2. Le tétraèdre $[\text{SiO}_4]$, constitue l'élément de base de presque tous les polymorphes de silice, ces derniers ne se différencient entre eux que par la connectivité du réseau tétraédrique. Par la suite, les différents modèles d'enchaînement des polymorphes de silice se traduisent par la présence de différentes propriétés structurales, physiques et chimiques^{30g, 198}.

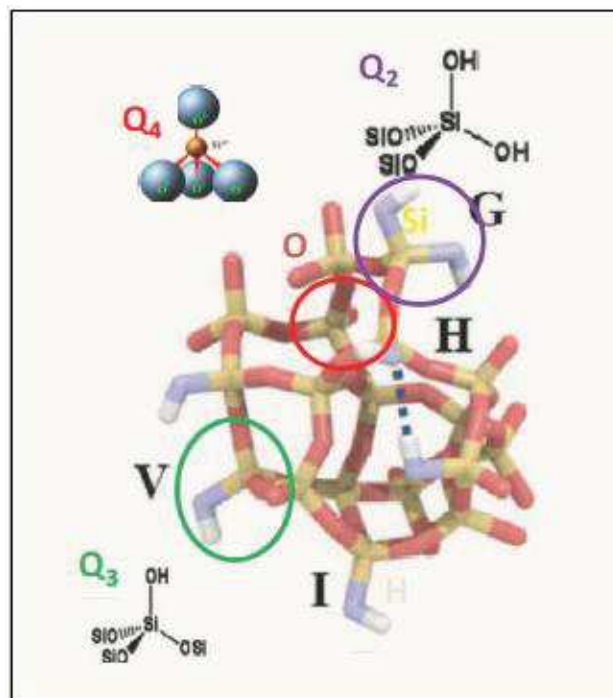


Figure II-25 : Un modèle en cluster de la structure de la silice amorphe^{30g}.

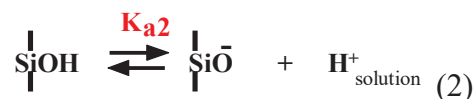
La silice amorphe est formée d'un enchaînement de tétraèdres de SiO_4 , Q^4 , dans le volume, par exemple dans le cercle rouge de la figure II-25. La surface de la silice amorphe ou la partie qui représente l'interface entre le matériau et l'environnement externe est riche en groupements silanols. Ces silanols peuvent être liés à un seul groupement hydroxyle (le Si est alors en environnement Q^3), ou bien à deux groupements hydroxyles (Si en environnement Q^2).

Du point de vue de la connectivité des liaisons, on peut donc distinguer silanols terminaux, géminaux (G) et en allant plus loin silanols vicinaux (V), représentant des hydroxyles appartenant à deux tétraèdres partageant un sommet commun (pont siloxane Si-O-Si). Mais il est aussi important d'établir une distinction selon les possibilités de liaison hydrogène entre silanols, qui dépendent du voisinage dans l'espace et non de la connectivité de liaison. On distingue ainsi les silanols isolés (I), qui ne peuvent pas établir de liaisons hydrogènes, des silanols associés (H) qui interagissent entre eux par liaison hydrogène.

i. Les paramètres physico-chimiques :

La silice est un matériau solide de densité comprise entre 2 et 3 g/cm³, de haut point de fusion (1700°C) et de point de charge nulle (PZC) comprise entre 2 et 3^{30g}. La liaison Si-O est de caractère covalent, comme il est prouvé par des calculs de mécanique quantique. Les données expérimentales et théoriques obtenues indiquent une charge de +1,4 pour chaque atome de silicium et -0,7 sur chaque atome d'oxygène¹⁹⁹.

Les propriétés de surface de la silice amorphe, et notamment ses propriétés d'adsorption, dépendent dans la plupart des cas de la présence des groupements silanols. A une concentration suffisante, ces groupes rendent la surface hydrophile. Les groupements OH sont les responsables directes de l'interaction avec les adsorbats qui sont capables d'interagir via liaisons hydrogènes ou plus généralement via des interactions de type donneur-accepteur. L'élimination de ces groupements, par exemple par activation thermique, conduit à une diminution de l'adsorption et une acquisition de caractères de plus en plus hydrophobes^{198a}. Par ailleurs, les groupements hydroxyles présentent une réactivité amphotère. Ils peuvent réagir comme bases en fixant un proton, ils créent alors une charge positive (1). Ils peuvent jouer le rôle d'acides et ils créent alors une charge négative en libérant un proton (2).



Plus précisément, les propriétés de la silice sont déterminées par :

- 1) L'activité chimique de la surface - cette activité dépend de la concentration et de la distribution des différents types de groupements OH, et de la présence des ponts siloxane.

- 2) la structure poreuse de la silice. Il existe de nombreuses modifications microporeuses (zéolithes) et mésoporeuses, mais nous n'avons travaillé qu'avec des silices non poreuses.

La modification chimique de la surface de la silice a suscité un grand intérêt; ce processus permet aux chercheurs de régler et de modifier les propriétés d'adsorption et les caractéristiques technologiques des matériaux composites^{198a}.

ii. Les techniques de caractérisation :

➤ Résonance magnétique nucléaire (RMN) :

❖ ²⁹Si CP MAS de la silice amorphe:

Dès les premiers stades de son développement, la RMN a été une technique de choix pour l'étude de la structure locale des silicates et des polymorphes de silice²⁰⁰.

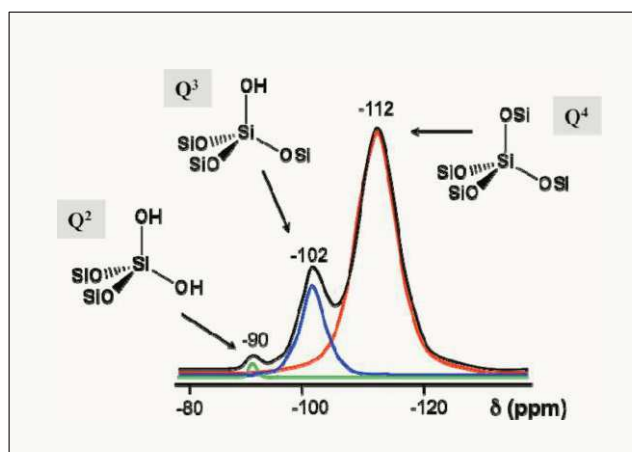
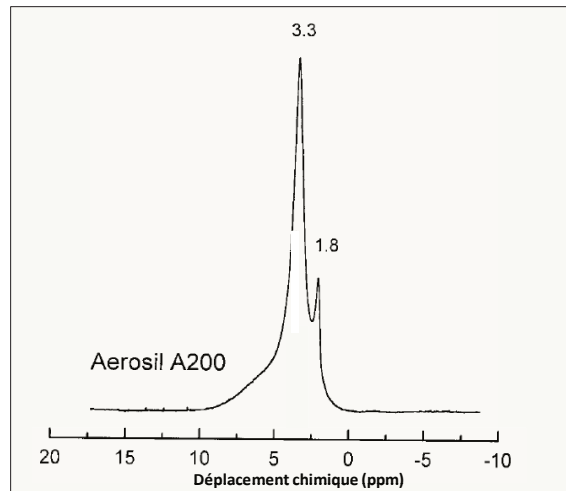


Figure II-26 : ²⁹Si CP MAS d'une silice de type Aérosil^{30g}.

Le silicium ²⁹Si est un noyau de spin ½ actif en RMN. Les analyses ²⁹Si RMN fournissent des spectres bien résolus avec des déplacements chimiques très sensibles à l'environnement moléculaire. Par conséquent, cette analyse apporte des informations structurales précises. Elle permet d'observer en particulier les groupements de surface qui diffèrent par l'environnement des atomes de silicium (voir supra, distinction Q²/Q³/Q⁴). Parfois les signaux spécifiques des groupements de surfaces sont masqués par les signaux de la silice massique. Toutefois, pour de nombreux types de silice amorphe, la surface spécifique dépasse plusieurs centaines de m²/g, dans ce cas le nombre total d'atomes présents sur la surface est suffisamment élevé pour que leur signal soit clairement évident dans le spectre^{30g}.

Normalement le volume interne comprend des environnements Q⁴ qui se manifestent dans le spectre ²⁹Si par un pic large à -112 ppm. D'autre part, la surface de la silice montre des environnements Q² et Q³, avec des maxima respectivement à environ -90 et -100^{30g}.

❖ ^1H RMN de la silice amorphe :Figure II-27 : ^1H MAS RMN d'aérosil 200²⁰¹.

La réactivité et l'utilisation de la silice sont intrinsèquement liées à la présence des groupements hydroxyles sur leur surface. Dans le but de comprendre et contrôler les propriétés de la silice, de nombreux travaux ont été donc consacrés à l'étude des protons de la surface, surtout par infrarouge, (^1H - ^{29}Si) CP MAS NMR, ^1H NMR (MAS, CRAMPS et multiple coherence)²⁰¹.

Par analyse RMN MAS de ^1H (figure II-27) on observe trois environnements de protons. Le premier environnement à 1,8 ppm correspond aux hydrogènes des hydroxyles non-accessibles à l'eau, les hydrogènes isolés. Le deuxième environnement à 3,3 ppm correspond aux hydrogènes des hydroxyles accessibles à l'eau, en échange rapide avec les protons de l'eau. Son maximum se déplace en fonction de l'état d'hydratation. Le dernier environnement est moins important et présent sous forme d'un pic large compris entre 5-7 ppm. Cet signal a été interprété par la présence de liaisons hydrogènes fortes²⁰¹.

➤ **Analyse thermogravimétrique (ATG) :**

L'analyse thermogravimétrique de la silice amorphe a été utilisée depuis longtemps. Les courbes TG présentent généralement la perte d'eau physisorbée à une température $<100^\circ\text{C}$, suivie par la condensation de différents types de silanols de surface qui se poursuit jusqu'à 1000°C . Bien que les analyses TG pourraient en principe évaluer la répartition des silanols de surface entre des populations de réactivités différentes à l'égard de la condensation (isolés vs associés), les tentatives d'exploration ou d'extraction d'informations complémentaires ne sont pas convaincantes^{30g}.

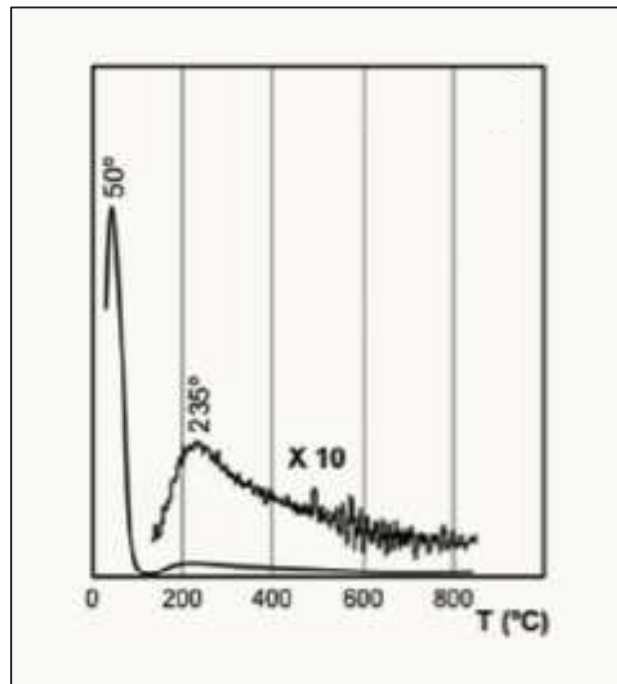


Figure II-28:Analyse thermogravimétrique d'Aérosil 380 sous flux d'air, $\beta = 5^\circ\text{C}/\text{min}$.

La figure ci-dessus présente la dérivée première de la perte de masse d'Aérosil 380. Le premier et le plus intense événement est observé à 50°C et due à la désorption de l'eau physisorbé. A des plus élevées, on observe un deuxième événement qui apparait sous forme d'un pic large avec un maximum dans la gamme de température $230\text{-}280^\circ\text{C}$ et qui s'étend légèrement peu à peu jusqu'à 1000°C . Comme il est dit plus haut, cet événement est dû à la condensation des groupements silanols^{30g}.

➤ Analyse infrarouge (FTIR- Raman)

La spectroscopie infrarouge a été utilisée pour analyser la silice amorphe en phase gazeuse ou sous vide depuis longtemps^{30g}. L'évolution du spectre IR de la silice amorphe dans la région $2750\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$ est représentée dans la figure II-29.

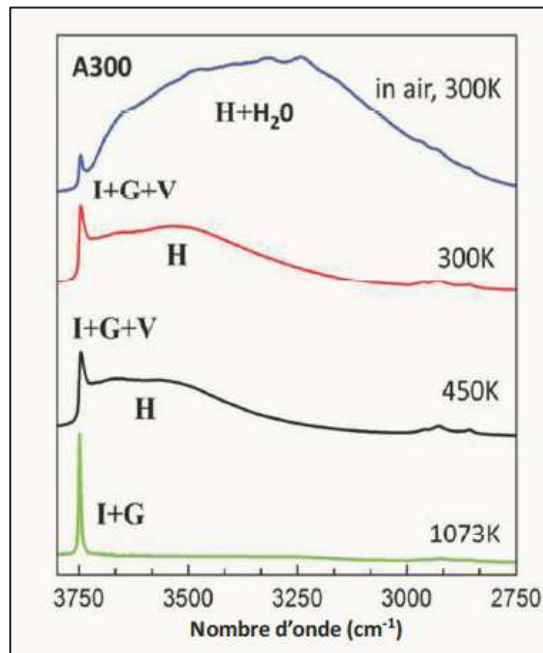


Figure II-29: Spectre IR de l'aérosil 300 après traitement sous vide à des températures croissantes. I : isolé, G : géminal, V : vicinal, H : en liaison hydrogène^{30g}.

Cette gamme contient les vibrations d'élongation de groupements OH ($\nu_{\text{O-H}}$). Lorsque la silice est exposée à l'air sans aucun prétraitement (300K), la contribution des hydroxyles de l'eau adsorbée est dominante. En même temps, la contribution des silanols (I, G, V) est présente sous forme d'une bande fine et peu intense. Le dégazage (traitement sous vide) de cet échantillon à 300K enlève directement une grande partie de l'eau adsorbée, en laissant quelques molécules adsorbées sur la surface. Cependant à 450K, la déshydratation est probablement totale. D'ailleurs, cette région présente une structure de bande compliquée. La bande étroite à 3747 cm^{-1} devient plus large et plus faible après dégazage, elle a été attribuée aux silanols isolés, non impliqués dans les liaisons hydrogènes. Enfin, le traitement sous vide à une température très élevée (1073K) provoque la disparition des hydroxyles liés par liaisons hydrogènes, due à leur condensation en siloxane (Si-O-Si)^{30g}.

III. Les argiles

III.1 Choix des argiles dans un contexte prébiotique

Les argiles sont très souvent utilisées par les biologistes qui veulent explorer les scénarios de surface de la chimie prébiotique. Suivant certaines idées radicales, une vie minérale aurait pu exister avant l'apparition de la vie organique (et peut-être même existerait-elle encore), consistant en des variétés différentes d'argiles, en compétition pour les "ressources naturelles" et soumises à une véritable sélection naturelle. Entre les feuillets successifs de l'argile peuvent se glisser de petites molécules organiques ; ainsi petit à petit la vie organique pourrait apparaître à partir de la vie cristalline.

Sans aller aussi loin, l'argile est un catalyseur efficace pour de nombreuses réactions organiques, et a donc ainsi pu jouer un rôle dans la formation des acides aminés, puis dans leur polymérisation ultérieure.

III.II Les principales catégories d'argiles

Les minéraux argileux constituent un sous-ensemble de la famille des oxydes lamellaires. Elles sont classées en trois catégories selon la charge électrique de leurs feuillets, figure II-30.

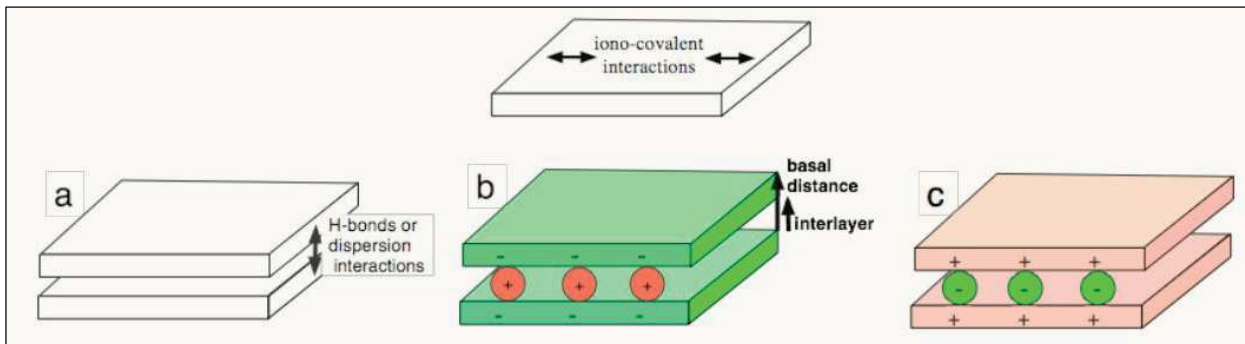


Figure II-30 : Les différentes catégories des minéraux argileux

- 1) Des couches neutres, comme dans la pyrophyllite ou la kaolinite. Les couches sont maintenues ensemble par des interactions de van der Waals et / ou des liaisons hydrogène.
- 2) Des couches chargées négativement. La structure dans l'ensemble doit être neutre, la charge de la couche négative doit donc être compensée exactement par une quantité égale de charges positives apportées par des cations situés dans l'espace interfoliaire (des cations de compensation). Dans la nature, ces minéraux sont les composés les plus répandues dans le groupe des phyllosilicates (surtout la montmorillonite) et sont nommés « argiles cationiques ».
- 3) Des couches chargées négativement avec des anions de compensation dans l'espace intercalaire. Le minéral naturel le plus fréquent dans ce groupe est l'hydrotalcite, qui n'est pas un phyllosilicate (car elle ne contient pas de silicium). Elles sont également nommées « argiles anioniques ».

III.III Les argiles cationiques

i. Principes généraux d'organisation

L'organisation des phyllosilicates est particulièrement riche et largement étudiée. Chaque couche de cette structure est en fait constituée par l'assemblage de deux ou trois feuillets qui peuvent être tétraédrique ou octaédrique.

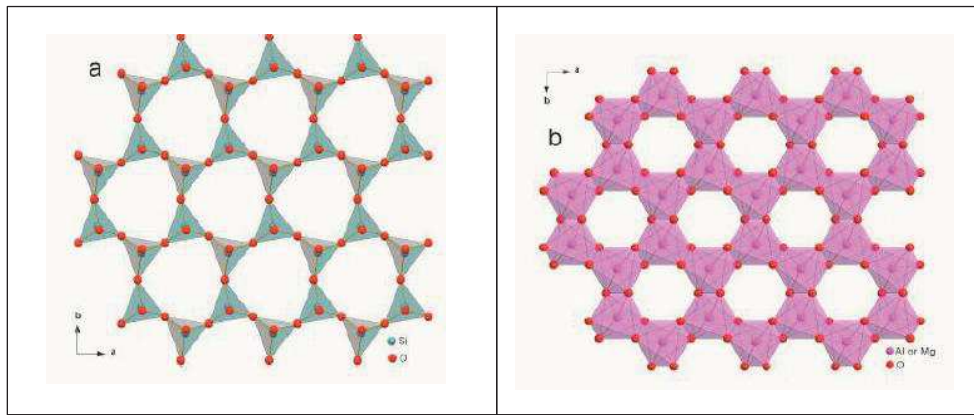


Figure II-31: illustration de la connectivité, dans le feuillet tétraédrique (a) d'une couche d'argile et dans un feuillet octaédrique (b) (pour un minéral dioctaédrique, où l'un des trois octaèdres est vacant).

Les feuillets tétraédriques « T » sont constitués d'unités tétraédriques $[XO_4]$ où X est un petit cation qui peut être soit Si^{4+} ou Al^{3+} , bien que d'autres substitutions soient possibles. D'autre part, les feuillets octaédrique « O » consistent en des unités $[MO_4(OH)_2]$, où M peut être soit un cation trivalent (ex : Al^{3+}), soit un divalent (Mg^{2+}) voire un monovalent (Li^+). Le site central de l'octaèdre peut être aussi vacant.

Les structures des feuillets tétraédriques et octaédriques, montrant la connectivité des unités élémentaires, sont présentées dans la figure II-31. Les tétraèdres partagent trois sommets sur quatre (les oxygènes « basaux »), le quatrième sommet (l'oxygène « apical ») étant relié à la couche octaédrique (« O »).

ii. Les critères de classification

1) Le type de la couche :

- 1 : 1 ou TO, la couche est formée d'un feuillet tétraédrique lié à un feuillet octaédrique.
- 2 : 1 ou TOT, deux feuillets tétraédriques sont liés aux deux côtés d'un feuillet octaédrique central. La structure la plus fréquente est celle de la montmorillonite, figure II-32.

2) L'occupation de l'octaèdre :

- Argiles de caractère «trioctaédrique », où tous les sites octaédriques sont occupés par un di-cation comme « Mg^{2+} ».
- Argiles de caractère «dioctaédrique », où 2/3 des sites octaédriques sont occupés par un tri-cation tel que « Al^{3+} » et le 3^{ème} site reste vacant.

A noter que les argiles «trioctaédriques » contiennent des di-cations, et inversement.

- 3) La charge de chaque couche qui provient des substitutions isomorphiques dans les couches. En effet, la substitution des cations de charges élevées par d'autres de charges plus faibles engendre un déficit de charges positives dans les couches, qui deviennent donc chargées négativement. Ces charges négatives doivent être compensées pour que l'ensemble de la structure soit neutre. Ceci est assuré par les cations de compensation dans l'espace interfoliaire.

Les substitutions peuvent être principalement présentes dans la couche octaédrique (par exemple, Al^{3+} remplacé par Mg^{2+} et Fe^{2+} ou Mg^{2+} remplacé par Li^+), ou dans la couche tétraédrique (par exemple, Si^{4+} remplacé par Al^{3+}).

Prenant en considération ces trois caractères de classification, il en résulte 9 groupes principaux d'argiles, dont un seul groupe sera discuté.

iii. Les smectites

Ce groupe est composé de phyllosilicates TOT planaires, ils sont aussi connus comme "argiles gonflantes". Leur nom vient du grec σμηκτικός, dont la signification est « détergent ». La charge des couches de trois feuillets varie entre 0,2 et 0,6 par demi-maille. Par exemple : La montmorillonite et la saponite.

III.IV Les caractères physico-chimiques des argiles :

i. Surface spécifique et porosité :

L'une des techniques de caractérisation les plus courantes appliquées aux matériaux solides est la physisorption d'azote basse température. En général, pour les argiles de type TOT, il existe deux types de surfaces spécifique : interne et externe. La surface spécifique externe est la surface géométrique des particules qui est accessible à la physisorption de N_2 . Cette surface varie de 30 à 130 m^2/g . La surface interne correspond à la surface basale des feuillets argileux. Elle n'est pas accessible à l'azote et peut être révélée par d'autres techniques comme l'adsorption de (EGME) ou de glycérol. La mesure de la quantité adsorbée donne accès à la surface de base totale qui est de l'ordre de 700 m^2/g .

ii. Propriétés chimiques

La réactivité à l'interface des argiles dépend évidemment de leur nature chimique. Les surfaces d'argiles sont chimiquement hétérogènes. En effet, les bords des particules d'argile doivent présenter

une réactivité différente de celle des plans basaux, et qui pourrait être similaire à celle des oxydes amphotères.

Les bords des particules d'argile correspondent à une rupture de la continuité des feuillets et exhibent des groupes semblables à ceux qu'on peut trouver à la surface d'oxydes amphotères comme l'alumine et la silice. Ces groupes peuvent avoir d'autres propriétés chimiques qui ne se trouvent pas sur les plans de base tels que la liaison hydrogène ou la capacité d'agir en tant que ligand. En résumé, les bords des particules d'argile seront en mesure de réagir de façon très différente des plans basaux aux interfaces solide- liquides ou gaz-solide. Le comportement amphotère signifie que les minéraux argileux ont des propriétés intrinsèques acido-basiques : une dispersion aqueuse de montmorillonite a un pH de 7,5.

iii. Capacité d'échange cationique

La notion de capacité d'échange cationique (CEC) provient de la science du sol, où elle désigne la capacité du sol à retenir les cations. Les cations du sol sont essentiellement retenus par les argiles chargées négativement grâce aux interactions électrostatiques. Comme mentionné précédemment, les cations de compensation doivent être présents dans les couches intermédiaires pour maintenir une charge neutre, et sont facilement échangeables par d'autres. La CEC représente alors la quantité totale de cations disponibles pour l'échange à un pH donné. Par exemple : la CEC de saponite est de 85 meq (milliéquivalents) par 100g, et celle de la montmorillonite est comprise entre 80 et 120 meq/100g.

iv. Intercalation et confinement dans l'espace intercalaire

La plupart des utilisations des argiles sont reliées aux réactions qui se déroulent dans les espaces interfoliaires. En fait, les propriétés des espèces intercalées sont le plus souvent différentes de celles des mêmes espèces en solution. L'espace interfoliaire peut être considéré comme un nanoréacteur qui impose aux espèces intercalées plusieurs modifications collectivement connues sous le nom d'effets de confinement, qui peuvent provenir de l'environnement local chimique, des restrictions de taille, d'une orientation spécifique, des limitations de la mobilité ...

Il existe plusieurs types d'intercalation :

- 1) Intercalation de petites molécules polaires (ex : l'eau).
- 2) Intercalation des polymères inorganiques volumineux.
- 3) Intercalation de composés organiques.

v. Gonflement

La capacité à gonfler dans l'eau (ou dans un solvant polaire), est une propriété qui définit le groupe smectite des argiles cationiques. A l'échelle moléculaire, cela implique l'intercalation de grandes quantités d'eau dans l'espace intercalaire entre les couches, ce qui entraîne une augmentation des distances interfoliaires. Dans un cas extrême, ce phénomène peut provoquer une délamination des couches d'argile et même il peut aboutir à une exfoliation si la distance entre les couches est suffisamment grande. Plus précisément, une quantité d'eau excessive aboutit à un gonflement osmotique qui se traduit par un passage d'une poudre hydratée à une pâte. Si l'on ajoute davantage d'eau, la dispersion de l'argile passe sous forme d'un gel qui peut persister jusqu'à une faible teneur globale d'argile : environ 10% pour Mt dans l'eau.

III.V La montmorillonite

La montmorillonite est un phyllosilicate d'aluminium et de magnésium hydraté, de formule $(\text{Na,Ca})_{0,3}(\text{Al, Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, et appartenant au groupe des smectites dioctaédriques, avec des substitutions $\text{Mg}^{2+} / \text{Al}^{3+}$ dans la couche octaédrique.

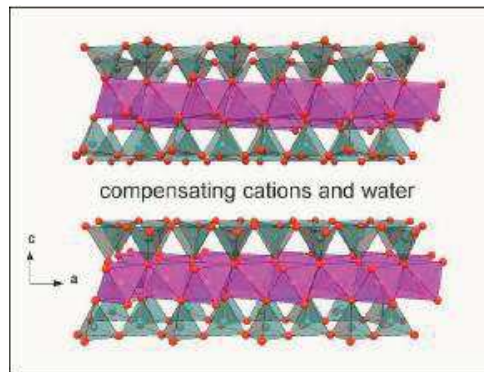


Figure II-32 : La structure de montmorillonite, présentant deux feuillets successifs l'espace interlamellaire est occupé par des cations de compensation avec différents degrés d'hydratation.

III.VI La saponite

La saponite est un phyllosilicate de magnésium de formule chimique $\text{Ca}_{0,25}(\text{Mg, Fe})_3(\text{Si, Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n(\text{H}_2\text{O})$. Contrairement à la montmorillonite, elle présente des substitutions ($\text{Al}^{3+} / \text{Mg}^{2+}$) dans les couches tétraédriques.

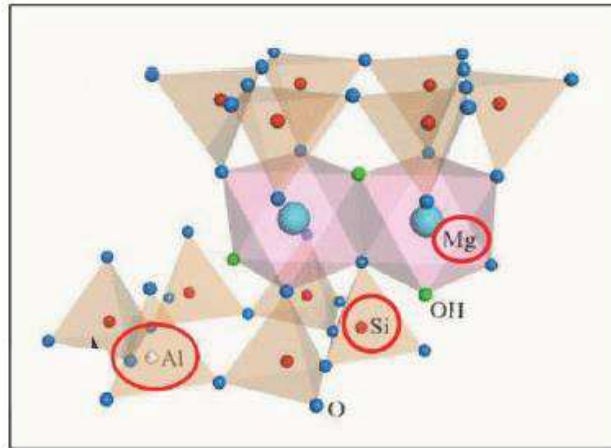


Figure II-33: La structure de la saponite.

Références bibliographiques

1. Raulin, F., De l'exobiologie à l'astrobiologie. Émergence et développement d'une nouvelle science interdisciplinaire. *La revue pour l'histoire du CNRS* **2008**, (23).
2. Brack, A., L'exobiologie ou l'origine chimique de la vie. *Formation planétaire et exoplanètes* **2006**, 309-332.
3. Gargaud, M., *L'environnement de la Terre primitive*. Presses Univ de Bordeaux: 2005.
4. Mandell, A. M.; Raymond, S. N.; Sigurdsson, S., Formation of Earth-like planets during and after giant planet migration. *The Astrophysical Journal* **2007**, 660 (1), 823.
5. Gargaud, M.; Montmerle, T.; Pascal, R.; López-García, P.; Martin, H., Young sun, early earth and the origins of life. **2012**.
6. Thomas, P. J.; Hicks, R. D.; Chyba, C. F.; McKay, C. P., *Comets and the Origin and Evolution of Life*. Springer Science & Business Media: 2006.
7. Patchett, P.; Samson, S., Ages and growth of the continental crust from radiogenic isotopes. *Treatise on geochemistry* **2003**, 3, 659.
8. Rigoutsos, I.; Stephanopoulos, G., *Systems biology*. Oxford University Press: 2006.
9. Gargaud, M.; Despois, D., *Les traces du vivant*. Presses Univ de Bordeaux: 2003.
10. Miller, S. L.; Urey, H. C.; Oro, J., Origin of organic compounds on the primitive earth and in meteorites. *Journal of Molecular Evolution* **1976**, 9 (1), 59-72.
11. (a) Paccalet, Y., *Jacques-Yves Cousteau dans l'océan de la vie*. JC Lattès: 1997; (b) Gamlin, L.; Vines, G., *The evolution of life*. Oxford University Press, USA: 1987.
12. (a) Bada, J. L., How life began on Earth: a status report. *Earth and Planetary Science Letters* **2004**, 226 (1), 1-15; (b) McCollom, T. M., Miller-Urey and beyond: what have we learned about prebiotic organic synthesis reactions in the past 60 years? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **2013**, 41, 207-229.
13. Bernal, J., *The Physical Basis of Life*. Routledge and Kegan London, 1951.
14. Cairns-Smith, A. G., *Seven clues to the origin of life: a scientific detective story*. Cambridge University Press: 1990.
15. Ferris, J. P.; Ertem, G., Montmorillonite catalysis of RNA oligomer formation in aqueous solution. A model for the prebiotic formation of RNA. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, 115 (26), 12270-12275.
16. McClendon, J. H., The origin of life. *Earth-Science Reviews* **1999**, 47 (1), 71-93.
17. Pace, N. R., Origin of life-facing up to the physical setting. *Cell* **1991**, 65 (4), 531-533.
18. Walter, M., Archean stromatolites- Evidence of the earth's earliest benthos. *Earth's earliest biosphere: Its origin and evolution(A 84-43051 21-51)*. Princeton, NJ, Princeton University Press, 1983 **1983**, 187-213.
19. Schopf, J. W.; Walter, M., Archean microfossils- New evidence of ancient microbes. *Earth's earliest biosphere: Its origin and evolution(A 84-43051 21-51)*. Princeton, NJ, Princeton University Press, 1983 **1983**, 214-239.
20. (a) Schopf, J. W., The oldest fossils and what they mean. *Major events in the history of life* **1992**, 29; (b) Schopf, J. W., The oldest known records of life: Early Archean stromatolites, microfossils, and organic matter. *Early life on Earth* **1994**, 193-206.
21. Zhu, S.; Zhu, M.; Knoll, A. H.; Yin, Z.; Zhao, F.; Sun, S.; Qu, Y.; Shi, M.; Liu, H., Decimetre-scale multicellular eukaryotes from the 1.56-billion-year-old Gaoyuzhuang Formation in North China. *Nature communications* **2016**, 7.
22. Saladino, R.; Botta, G.; Pino, S.; Costanzo, G.; Di Mauro, E., Genetics first or metabolism first? The formamide clue. *Chemical Society reviews* **2012**, 41 (16), 5526-65.
23. Andras, P.; Andras, C., The origins of life—the 'protein interaction world'hypothesis: protein interactions were the first form of self-reproducing life and nucleic acids evolved later as memory molecules. *Medical hypotheses* **2005**, 64 (4), 678-688.
24. (a) Higgs, P. G.; Lehman, N., The RNA World: molecular cooperation at the origins of life. *Nature Reviews Genetics* **2015**, 16 (1), 7-17. (b) Gilbert, W., Origin of life: The RNA world. *Nature* **1986**, 319 (6055).
25. Joyce, G. F., The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* **2002**, 418 (6894), 214-221.

26. Patel, B. H.; Percivalle, C.; Ritson, D. J.; Duffy, C. D.; Sutherland, J. D., Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nature chemistry* **2015**, *7* (4), 301-7.
27. Dahm, R., Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental biology* **2005**, *278* (2), 274-288.
28. Benner, S. A.; Kim, H.-J.; Carrigan, M. A., Asphalt, Water, and the Prebiotic Synthesis of Ribose, Ribonucleosides, and RNA. *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45* (12), 2025-2034.
29. Bean, H. D.; Sheng, Y.; Collins, J. P.; Anet, F. A.; Leszczynski, J.; Hud, N. V., Formation of a β -pyrimidine nucleoside by a free pyrimidine base and ribose in a plausible prebiotic reaction. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (31), 9556-9557.
30. (a) Lambert, J.-F., Adsorption and polymerization of amino acids on mineral surfaces: A review. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **2008**, *38* (3), 211-242; (b) Georgelin, T.; Jaber, M.; Bazzi, H.; Lambert, J.-F., Formation of Activated Biomolecules by Condensation on Mineral Surfaces - A Comparison of Peptide Bond Formation and Phosphate Condensation. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **2013**, *43* (4-5), 429-443; (c) Georgelin, T.; Jaber, M.; Onfroy, T.; Hargrove, A.-A.; Costa-Torro, F.; Lambert, J.-F., Inorganic Phosphate and Nucleotides on Silica Surface: Condensation, Dismutation, and Phosphorylation. *Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117* (24), 12579-12590; (d) Meng, M.; Stievano, L.; Lambert, J. F., Adsorption and thermal condensation mechanisms of amino acids on oxide supports. 1. Glycine on silica. *Langmuir* **2004**, *20* (3), 914-923; (e) Meng, M.; Stievano, L.; Lambert, J. F., Adsorption and thermal condensation of glycine on SiO₂. *Chinese Journal of Catalysis* **2005**, *26* (5), 393-398; (f) Stievano, L.; Piao, L. Y.; Lopes, I.; Meng, M.; Costa, D.; Lambert, J.-F., Glycine and lysine adsorption and reactivity on the surface of amorphous silica. *European Journal of Mineralogy* **2007**, *19* (3), 321-331; (g) Rimola, A.; Costa, D.; Sodupe, M.; Lambert, J.-F.; Ugliengo, P., Silica surface features and their role in the adsorption of bio-molecules: computational modeling and experiments. *Chem. Rev.* **2013**, *on line*.
31. (a) Ferris, J. P.; Hill Jr, A. R.; Liu, R.; Orgel, L. E., Synthesis of long prebiotic oligomers on mineral surfaces. **1996**; (b) Ferris, J.; Joshi, P.; Wang, K.-J.; Miyakawa, S.; Huang, W., Catalysis in prebiotic chemistry: application to the synthesis of RNA oligomers. *Advances in Space Research* **2004**, *33* (1), 100-105.
32. (a) Bernhardt, H. S.; Tate, W. P., Primordial soup or vinaigrette: did the RNA world evolve at acidic pH? *Biology direct* **2012**, *7* (1), 1; (b) Li, Y.; Breaker, R. R., Kinetics of RNA degradation by specific base catalysis of transesterification involving the 2'-hydroxyl group. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (23), 5364-5372; (c) Kua, J.; Bada, J. L., Primordial ocean chemistry and its compatibility with the RNA world. *Origins of life and evolution of the biosphere : the journal of the International Society for the Study of the Origin of Life* **2011**, *41* (6), 553-8; (d) Dallas, A.; Vlassov, A.; Kazakov, S., Principles of nucleic acid cleavage by metal ions. In *Artificial nucleases*, Springer: 2004; pp 61-88.
33. (a) Breslow, R., On the mechanism of the formose reaction. *Tetrahedron letters* **1959**, *1* (21), 22-26 ; (b) Kopetzki, D.; Antonietti, M., Hydrothermal formose reaction. *New Journal of Chemistry* **2011**, *35* (9), 1787-1794.
34. Larralde, R.; Robertson, M. P.; Miller, S. L., RATES OF DECOMPOSITION OF RIBOSE AND OTHER SUGARS - IMPLICATIONS FOR CHEMICAL EVOLUTION. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92* (18), 8158-8160.
35. Hulet, H., Limitations on prebiological synthesis. *Journal of theoretical biology* **1969**, *24* (1), 56-72.
36. Eigner, J.; Boedtker, H.; Michaels, G., The thermal degradation of nucleic acids. *Biochimica et biophysica acta* **1961**, *51* (1), 165-168.
37. Cockell, C. S.; Horneck, G., The History of the UV Radiation Climate of the Earth—Theoretical and Space-based Observations. *Photochemistry and Photobiology* **2001**, *73* (4), 447-451.
38. Görner, H., New trends in photobiology: Photochemistry of DNA and related biomolecules: Quantum yields and consequences of photoionization. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1994**, *26* (2), 117-139.
39. Mulkiidjanian, A. Y.; Cherepanov, D. A.; Galperin, M. Y., Survival of the fittest before the beginning of life: selection of the first oligonucleotide-like polymers by UV light. *BMC evolutionary biology* **2003**, *3* (1), 1.
40. Biondi, E.; Branciamore, S.; Maurel, M.-C.; Gallori, E., Montmorillonite protection of an UV-irradiated hairpin ribozyme: evolution of the RNA world in a mineral environment. *BMC evolutionary biology* **2007**, *7* (Suppl 2), S2.

41. Cleaves, H. J.; Miller, S. L., Oceanic protection of prebiotic organic compounds from UV radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95* (13), 7260-7263.
42. Gull, M., Prebiotic phosphorylation reactions on the early Earth. *Challenges* **2014**, *5* (2), 193-212.
43. Degani, C.; Halmann, M., D-Glucose 1-phosphate formation by cyanogen-induced phosphorylation of D-glucose. Synthesis, mechanism, and application to other reducing sugars. *Journal of the Chemical Society C: Organic* **1971**, 1459-1465.
44. Hargreaves, W.; Mulvihill, S.; Deamer, D., Synthesis of phospholipids and membranes in prebiotic conditions. *Nature* **1977**, *266*, 78-80.
45. Maheen, G.; Wang, Y.; Wang, Y.; Shi, Z.; Tian, G.; Feng, S., Mimicking the prebiotic acidic hydrothermal environment: One-pot prebiotic hydrothermal synthesis of glucose phosphates. *Heteroatom Chemistry* **2011**, *22* (2), 186-191.
46. Ni, F.; Sun, S.; Huang, C.; Zhao, Y., N-phosphorylation of amino acids by trimetaphosphate in aqueous solution—learning from prebiotic synthesis. *Green Chemistry* **2009**, *11* (4), 569-573.
47. Tshako, M.; Fujimoto, M.; Ohashi, S., Phosphorylation of inosine with cyclo-triphosphate. *Chemistry Letters* **1981**, (7), 849-852.
48. Schwartz, A.; Ponnampertuma, C., Phosphorylation on the primitive earth: Phosphorylation of adenosine with linear polyphosphate salts in aqueous solution. *Nature* **1968**, *218*, 443.
49. (a) Inoue, H.; Nakayama, H.; Tshako, M., A one-step phosphorylation of D-aldoheptoses and D-aldoheptoses with inorganic cyclo-triphosphate. *Carbohydrate research* **2000**, *324* (1), 10-16; (b) Saffhill, R., Selective phosphorylation of the cis-2', 3'-diol of unprotected ribonucleosides with trimetaphosphate in aqueous solution. *The Journal of Organic Chemistry* **1970**, *35* (9), 2881-2883.
50. Yamagata, Y.; Inoue, H.; Inomata, K., Specific effect of magnesium ion on 2', 3'-cyclic AMP synthesis from adenosine and trimeta phosphate in aqueous solution. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **1995**, *25* (1-3), 47-52.
51. (a) Lindh, U., Biological functions of the elements. In *Essentials of Medical Geology*, Springer: 2013; pp 129-177; (b) Holm, N. G., The significance of Mg in prebiotic geochemistry. *Geobiology* **2012**, *10* (4), 269-279.
52. (a) Prieur, B. E. In *Phosphorylation of ribose in the presence of borate salts*, Origins of Life and Evolution of Biospheres, springer van godewijckstraat 30, 3311 gz dordrecht, netherlands: 2009; pp 264-265; (b) Scorei, R., Is boron a prebiotic element? A mini-review of the essentiality of boron for the appearance of life on Earth. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **2012**, *42* (1), 3-17.
53. Hagan, W. J., Uracil-Catalyzed Synthesis of Acetyl Phosphate: A Photochemical Driver for Protometabolism. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2010**, *11* (3), 383-387.
54. Saygin, Ö., Nonenzymatic phosphorylation of acetate by carbamyl phosphate. *Origins of life* **1983**, *13* (1), 43-48.
55. Schoffstall, A. M., Prebiotic phosphorylation of nucleosides in formamide. *Origins of life* **1976**, *7* (4), 399-412.
56. (a) Schoffstall, A. M., Prebiotic phosphorylation of nucleosides in formamide. *Origins of life* **1976**, *7* (4), 399-412; (b) Schoffstall, A. M.; Laing, E. M., Phosphorylation mechanisms in chemical evolution. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **1985**, *15* (2), 141-150.
57. Costanzo, G.; Saladino, R.; Crestini, C.; Ciciriello, F.; Di Mauro, E., Nucleoside phosphorylation by phosphate minerals. *The Journal of biological chemistry* **2007**, *282* (23), 16729-35.
58. Gull, M.; Zhou, M.; Fernández, F. M.; Pasek, M. A., Prebiotic phosphate ester syntheses in a deep eutectic solvent. *Journal of Molecular Evolution* **2014**, *78* (2), 109-117.
59. Mamajanov, I.; Engelhart, A. E.; Bean, H. D.; Hud, N. V., DNA and RNA in Anhydrous Media: Duplex, Triplex, and G-Quadruplex Secondary Structures in a Deep Eutectic Solvent. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (36), 6310-6314.
60. Pasek, M. A.; Kee, T. P., On the Origin of Phosphorylated Biomolecules. In *Origins of Life: The Primal Self-Organization*, Egel, R.; Lankenau, D.-H.; Mulkidjanian, Y. A., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011; pp 57-84.
61. Gulick, A., Phosphorus as a factor in the origin of life. *American scientist* **1955**, *43* (3), 479-489.

62. Cooper, G. W.; Onwo, W. M.; Cronin, J. R., Alkyl phosphonic acids and sulfonic acids in the Murchison meteorite. *Geochimica et cosmochimica acta* **1992**, *56* (11), 4109-4115.
63. De Graaf, R.; Schwartz, A. W., Thermal synthesis of nucleoside H-phosphonates under mild conditions. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **2005**, *35* (1), 1-10.
64. Pasek, M. A.; Lauretta, D. S., Aqueous corrosion of phosphide minerals from iron meteorites: a highly reactive source of prebiotic phosphorus on the surface of the early Earth. *Astrobiology* **2005**, *5* (4), 515-535.
65. Pasek, M. A.; Dworkin, J. P.; Lauretta, D. S., A radical pathway for organic phosphorylation during schreibersite corrosion with implications for the origin of life. *Geochimica et cosmochimica acta* **2007**, *71* (7), 1721-1736.
66. Ponnampereuma, C.; Sagan, C.; Mariner, R., Synthesis of Adenosine Triphosphate Under Possible Primitive Earth Conditions. *Nature* **1963**, *199* (4890), 222-226.
67. (a) Schramm, G., Synthesis of Nucleosides and Polynucleotides with Metaphosphate Esters A2 - FOX, SIDNEY W. In *The Origins of Prebiological Systems and of their Molecular Matrices*, Academic Press: 1965; pp 299-315; (b) Schramm, G., The Origins of Prebiological Systems. *Academic Press* **1965**, 299.
68. Orgel, L.; Ponnampereuma, C.; Reid, C., Nucleoside synthesis under potentially prebiotic conditions. **1967**.
69. Fuller, W. D.; Sanchez, R. A.; Orgel, L. E., Studies in prebiotic synthesis: VI. Synthesis of purine nucleosides. *Journal of molecular biology* **1972**, *67* (1), 25-33.
70. Fuller, W.; Sanchez, R.; Orgel, L., Studies in prebiotic synthesis. VII. *Journal of Molecular Evolution* **1972**, *1* (3), 249-257.
71. W. D. Fuller, R. A. S., and L. E. Orgel, Studies in prebiotic synthesis VII. **1972**, *67*, 25-33.
72. Nikolaeva, M. V. K., M. A., Abiogenic thermal synthesis of nucleosides. *Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii* **1972**, *8*, 18-23.
73. Tsupkina, E. A. K. a. N. V., *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* **1978**, *1*, 213-218.
74. Sanchez, R. A.; Orgel, L. E., Studies in prebiotic synthesis: V. Synthesis and photoanomerization of pyrimidine nucleosides. *Journal of molecular biology* **1970**, *47* (3), 531-543.
75. Powner, M. W.; Gerland, B.; Sutherland, J. D., Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions. *Nature* **2009**, *459* (7244), 239-42.
76. Sheng, Y.; Bean, H. D.; Mamajanov, I.; Hud, N. V.; Leszczynski, J., Comprehensive investigation of the energetics of pyrimidine nucleoside formation in a model prebiotic reaction. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (44), 16088-16095.
77. Chen, M. C.; Cafferty, B. J.; Mamajanov, I.; Gallego, I.; Khanam, J.; Krishnamurthy, R.; Hud, N. V., Spontaneous prebiotic formation of a beta-ribofuranoside that self-assembles with a complementary heterocycle. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (15), 5640-6.
78. Cafferty, B. J.; Fialho, D. M.; Khanam, J.; Krishnamurthy, R.; Hud, N. V., Spontaneous formation and base pairing of plausible prebiotic nucleotides in water. *Nature communications* **2016**, *7*, 11328.
79. Singh, P.; Singh, A.; Kaur, J.; Holzer, W., H-Bond activated glycosylation of nucleobases: implications for prebiotic nucleoside synthesis. *RSC Adv.* **2014**, *4* (7), 3158-3161.
80. (a) Ingar, A. A.; Luke, R. W.; Hayter, B. R.; Sutherland, J. D., Synthesis of cytidine ribonucleotides by stepwise assembly of the heterocycle on a sugar phosphate. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2003**, *4* (6), 504-7; (b) Sutherland, J. D., Ribonucleotides. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2010**, *2* (4), a005439.
81. (a) Stankevich, E. I. D., I.; Liepins, E.; Snikeris, D. N., *Khimii Nukleozidov i Nukleotidov.* **1978**, *63*; (b) Wojtowicz, M., *Acta Pol. Pharm.* . 1994; Vol. 51,81.
82. Cech, D.; Koenig, J.; Koepfel, H.; Moeller, S.; Herrmann, G., Geschützte Amino-oxazoline der Arabinose und Ribose. *Journal für Praktische Chemie* **1981**, *323* (5), 747-754.
83. Šilhár, P. P., R.; Votruba, I.; Hocek, M., *Synthesis and Cytostatic Activity of Novel 6-(Difluoromethyl)purine Bases and Nucleosides.* 2006; p 1848-1852.
84. (a) Delidovich, I. V.; Taran, O. P.; Parmon, V. N., Plausible prebiotic synthesis of aldopentoses from simple substrates, glycolaldehyde and formaldehyde. *Paleontological Journal* **2013**, *47* (9), 1093-1096; (b)

- Lambert, J. B.; Guruswamy-Thangavelu, S. A., The Role of Silicates in the Synthesis of Sugars Under Prebiotic Conditions. **2014**, *5*, 19-25.
85. Saladino, R.; Ciambecchini, U.; Crestini, C.; Costanzo, G.; Negri, R.; Di Mauro, E., One-pot TiO₂-catalyzed synthesis of nucleic bases and acyclonucleosides from formamide: implications for the origin of life. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2003**, *4* (6), 514-21.
86. (a) Merle, Y.; Bonneil, E.; Merle, L.; Sági, J.; Szemző, A., Acyclic oligonucleotide analogues. *International journal of biological macromolecules* **1995**, *17* (5), 239-246; (b) Rekoske, J. E.; Barteau, M. A., Competition between acetaldehyde and crotonaldehyde during adsorption and reaction on anatase and rutile titanium dioxide. *Langmuir* **1999**, *15* (6), 2061-2070.
87. Joyce, G. F.; Schwartz, A. W.; Miller, S. L.; Orgel, L. E., The case for an ancestral genetic system involving simple analogues of the nucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, *84* (13), 4398-4402.
88. Benner, S. A., Understanding nucleic acids using synthetic chemistry. *Accounts of Chemical Research* **2004**, *37* (10), 784-797..
89. Cafferty, B. J.; Hud, N. V., Abiotic synthesis of RNA in water: a common goal of prebiotic chemistry and bottom-up synthetic biology. *Current opinion in chemical biology* **2014**, *22*, 146-57.
90. Zubay, G.; Mui, T., Prebiotic Synthesis of Nucleotides. *Orig. Life Evol. Biosphere* **2001**, *31* (1-2), 87-102.
91. Schoffstall, A. M.; Mahone, S. M., Formate ester formation in amide solutions. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **1988**, *18* (4), 389-396..
92. Decker, P.; Schweer, H.; Pohlamnn, R., Bioids: X. Identification of formose sugars, presumable prebiotic metabolites, using capillary gas chromatography/gas chromatography—mas spectrometry of n-butoxime trifluoroacetates on OV-225. *Journal of Chromatography A* **1982**, *244* (2), 281-291.
93. Hud, N. V.; Cafferty, B. J.; Krishnamurthy, R.; Williams, L. D., The origin of RNA and "my grandfather's axe". *Chemistry & biology* **2013**, *20* (4), 466-74.
94. Altern Kolb, V.; Dworkin, J.; Miller, S., Alternative bases in the RNA world: the prebiotic synthesis of urazole and its ribosides. *Journal of Molecular Evolution* **1994**, *38* (6), 549-557.
95. Rios, A. C.; Tor, Y., On the Origin of the Canonical Nucleobases: An Assessment of Selection Pressures across Chemical and Early Biological Evolution. *Israel journal of chemistry* **2013**, *53* (6-7), 469-483.
96. Maurel, M.-C.; Convert, O., Chemical structure of a prebiotic analog of adenosine. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **1990**, *20* (1), 43-48.
97. (a) Hatfield, D.; Wyngaarden, J. B., 3-Ribosylpurines I. Synthesis of (3-ribosyluric acid) 5'-phosphate and (3-ribosylxanthine) 5'-phosphate by a pyrimidine ribonucleotide pyrophosphorylase of beef erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry* **1964**, *239* (8), 2580-2586; (b) Hatfield, D.; Wyngaarden, J. B., 3-Ribosylpurines ii. studies on (3-ribosylxanthine) 5'-phosphate and on ribonucleotide derivatives of certain uracil analogues. *Journal of Biological Chemistry* **1964**, *239* (8), 2587-2592.
98. Beaumont, S., *Biologie moléculaire-Génétique UE1 PACES*. 2016.
99. Breslow, R.; Cheng, Z. L., On the origin of terrestrial homochirality for nucleosides and amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106* (23), 9144-6.
100. (a) Ortiz, P.; Fernandez-Bertran, J.; Reguera, E., Role of the anion in the alkali halides interaction with D-ribose: a H-1 and C-13 NMR spectroscopy study. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2005**, *61* (8), 1977-1983; (b) Rudrum, M.; Shaw, D., 10. The structure and conformation of some monosaccharides in solution. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1965**, 52-57.
101. Maurel, M.-C.; Décout, J.-L., Origins of life: molecular foundations and new approaches. *Tetrahedron* **1999**, *55* (11), 3141-3182.
102. Gross, A.; Abril, O.; Lewis, J. M.; Geresh, S.; Whitesides, G. M., Practical synthesis of 5-phospho-D-ribose. alpha.-1-pyrophosphate (PRPP): enzymatic routes from ribose 5-phosphate or ribose. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105* (25), 7428-7435.
103. Cleaves li, H. J., The prebiotic geochemistry of formaldehyde. *Precambrian Research* **2008**, *164* (3-4), 111-118.
104. Stribling, R.; Miller, S. L., Energy yields for hydrogen cyanide and formaldehyde syntheses: the HCN and amino acid concentrations in the primitive ocean. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **1987**, *17* (3-4), 261-273.

105. Ferris, J.; Chen, C., Chemical evolution. XXVI. Photochemistry of methane, nitrogen, and water mixtures as a model for the atmosphere of the primitive earth. *Journal of the American Chemical Society* **1975**, *97* (11), 2962-2967.
106. Ferris, J., The potential for prebiotic synthesis in hydrothermal systems. *Orig. Life Evol. Biosph.* **1994**, *24*, pp. 363–381.
107. C. Chyba, P. T., L. Brookshaw, C. Sagan, Cometary delivery of organic molecules to the early Earth. *Science* **1990**, *249*, pp. 366–373.
108. Delidovich, I. V.; Simonov, A. N.; Taran, O. P.; Parmon, V. N., Catalytic formation of monosaccharides: from the formose reaction towards selective synthesis. *ChemSusChem* **2014**, *7* (7), 1833-46.
109. Shigemasa, Y.; Kawahara, M.; Sakazawa, C.; Nakashima, R.; Matsuura, T., Formose reactions: IX. Selective formation of branched sugar alcohols in a modified formose reaction and factors affecting the selectivity. *Journal of Catalysis* **1980**, *62* (1), 107-116.
110. Sisak, D.; McCusker, L. B.; Zandomenighi, G.; Meier, B. H.; Blaeser, D.; Boese, R.; Schweizer, W. B.; Gilmour, R.; Dunitz, J. D., The Crystal Structure of D-Ribose At Last! *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, *49* (26), 4503-4505.
111. Ricardo, A.; Carrigan, M. A.; Olcott, A. N.; Benner, S. A., Borate minerals stabilize ribose. *Science* **2004**, *303* (5655), 196-196.
112. Lambert, J. B.; Lu, G.; Singer, S. R.; Kolb, V. M., Silicate complexes of sugars in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (31), 9611-9625.
113. Georgelin, T.; Jaber, M.; Fournier, F.; Laurent, G.; Costa-Torro, F.; Maurel, M. C.; Lambert, J. F., Stabilization of ribofuranose by a mineral surface. *Carbohydrate research* **2015**, *402*, 241-4.
114. Hockett, R. C.; Guttag, A.; Smith, M. E., The Production of Furfural from D-Lyxose and D-Ribose. *Journal of the American Chemical Society* **1943**, *65* (1), 1-3.
115. (a) Enslow, K. R.; Bell, A. T., The Role of Metal Halides in Enhancing the Dehydration of Xylose to Furfural. *ChemCatChem* **2015**, *7* (3), 479-489; (b) Marcotullio, G.; de Jong, W., Furfural formation from d-xylose: the use of different halides in dilute aqueous acidic solutions allows for exceptionally high yields. *Carbohydrate research* **2011**, *346* (11), 1291-3; (c) Liu, C.; Wyman, C. E., The enhancement of xylose monomer and xylotriose degradation by inorganic salts in aqueous solutions at 180 degrees C. *Carbohydrate research* **2006**, *341* (15), 2550-6.
116. Amaral, A. F.; Marques, M. M.; da Silva, J. A. L.; Fraústo da Silva, J. J. R., Interactions of d-ribose with polyatomic anions, and alkaline and alkaline-earth cations: possible clues to environmental synthesis conditions in the pre-RNA world. *New Journal of Chemistry* **2008**, *32* (11), 2043.
117. Raemy, A.; Schweizer, T., Thermal behaviour of carbohydrates studied by heat flow calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **1983**, *28* (1), 95-108.
118. Mathlouthi, M.; Seuvre, A. M.; Koenig, J. L., FT-IR and laser-Raman spectra of d-ribose and 2-deoxy-d-erythro-pentose ("2-deoxy-d-ribose"). *Carbohydrate research* **1983**, *122* (1), 31-47.
119. (a) Yaylayan, V. A. I., A. A., Determination of the Effect of Temperature on the Concentration of Keto Form of D-Fructose by FT-IR Spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **1992**, *11* (2), 149-158; (b) Yaylayan, V. A.; Ismail, A. A., Investigation of the enolization and carbonyl group migration in reducing sugars by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate research* **1995**, *276* (2), 253-265.
120. Lane, M.; Thomas Jr, G., Kinetics of hydrogen-deuterium exchange in guanosine 5'-monophosphate and guanosine 3': 5'-monophosphate determined by laser-Raman spectroscopy. *Biochemistry* **1979**, *18* (18), 3839-3846.
121. Tajmir-Riahi, H.; Theophanides, T., Adenosine-5'-monophosphate complexes of Pt (II) and Mg (II) metal ions. Synthesis, FT · IR spectra and structural studies. *Inorganica chimica acta* **1983**, *80*, 183-190.
122. Mathlouthi, M.; Seuvre, A.-M.; Koenig, J. L., Ft-ir and laser-Raman spectra of adenine and adenosine. *Carbohydrate research* **1984**, *131* (1), 1-15.
123. Lu, Y.; Deng, G.; Miao, F.; Li, Z., Sugar complexation with calcium ion. Crystal structure and FT-IR study of a hydrated calcium chloride complex of d-ribose. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2003**, *96* (4), 487-492.
124. Oró, J.; Kimball, A., Synthesis of purines under possible primitive earth conditions. I. Adenine from hydrogen cyanide. *Archives of biochemistry and biophysics* **1961**, *94* (2), 217-227.

125. Levy, M.; Miller, S. L.; Oró, J., Production of guanine from NH₄CN polymerizations. *Journal of Molecular Evolution* **1999**, *49* (2), 165-168.
126. (a) Hill, A.; Orgel, L. E., Synthesis of adenine from HCN tetramer and ammonium formate. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **2002**, *32* (2), 99-102; (b) Ferris, J. P.; Orgel, L., An Unusual Photochemical Rearrangement in the Synthesis of Adenine from Hydrogen Cyanide¹. *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88* (5), 1074-1074.
127. Quirico, E.; Montagnac, G.; Lees, V.; McMillan, P. F.; Szopa, C.; Cernogora, G.; Rouzaud, J.-N.; Simon, P.; Bernard, J.-M.; Coll, P.; Fray, N.; Minard, R. D.; Raulin, F.; Reynard, B.; Schmitt, B., New experimental constraints on the composition and structure of tholins. *Icarus* **2008**, *198* (1), 218-231.
128. (a) Matthews, C. N.; Minard, R. D., Hydrogen cyanide polymers, comets and the origin of life. *Faraday Discussions* **2006**, *133*, 393; (b) Ruiz-Bermejo, M.; Menor-Salván, C.; de la Fuente, J. L.; Mateo-Martí, E.; Osuna-Esteban, S.; Martín-Gago, J. Á.; Veintemillas-Verdaguer, S., CH₄/N₂/H₂-spark hydrophobic tholins: A systematic approach to the characterisation of tholins. Part II. *Icarus* **2009**, *204* (2), 672-680; (c) Navarro-González, R.; Negrón-Mendoza, A.; Aguirre-Calderón, M.; Ponnampereuma, C., The γ -irradiation of aqueous hydrogen cyanide in the presence of ferrocyanide or ferricyanide: implications to prebiotic chemistry. *Advances in Space Research* **1989**, *9* (6), 57-61.
129. Ferris, J.; Joshi, P.; Edelson, E.; Lawless, J., HCN: a plausible source of purines, pyrimidines and amino acids on the primitive Earth. *Journal of Molecular Evolution* **1978**, *11* (4), 293-311.
130. (a) Miyakawa, S.; Cleaves, H. J.; Miller, S. L., The cold origin of life: A. Implications based on the hydrolytic stabilities of hydrogen cyanide and formamide. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **2002**, *32* (3), 195-208; (b) Miyakawa, S.; Cleaves, H. J.; Miller, S. L., The cold origin of life: B. Implications based on pyrimidines and purines produced from frozen ammonium cyanide solutions. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **2002**, *32* (3), 209-218.
131. (a) Robertson, M. P.; Miller, S. L., An efficient prebiotic synthesis of cytosine and uracil. **1995**; (b) Ferris, J.; Zamek, O.; Altbuch, A.; Freiman, H., Chemical evolution. *Journal of Molecular Evolution* **1974**, *3* (4), 301-309.
132. Spöner, J. E.; Spöner, J.; Novakova, O.; Brabec, V.; Sedo, O.; Zdrahal, Z.; Costanzo, G.; Pino, S.; Saladino, R.; Di Mauro, E., Emergence of the First Catalytic Oligonucleotides in a Formamide-Based Origin Scenario. *Chemistry* **2016**, *22* (11), 3572-86.
133. Yamada, H.; Hirobe, M.; Higashiyama, K.; Takahashi, H.; Suzuki, K. T., Detection of carbon-13-nitrogen-15 coupled units in adenine derived from doubly labeled hydrogen cyanide or formamide. *Journal of the American Chemical Society* **1978**, *100* (14), 4617-4618
134. Schwartz, A. W., Did minerals perform prebiotic combinatorial chemistry? *Chemistry & biology* **1996**, *3* (7), 515-518.
135. Bonner, W. A.; Hall, H.; Chow, G.; Liang, Y.; Lemmon, R. M., The radiolysis and radoracemization of amino acids on clays. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **1985**, *15* (2), 103-114.
136. Saladino, R.; Crestini, C.; Ciambecchini, U.; Ciciriello, F.; Costanzo, G.; Di Mauro, E., Synthesis and degradation of nucleobases and nucleic acids by formamide in the presence of montmorillonites. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2004**, *5* (11), 1558-66.
137. Saladino, R.; Crestini, C.; Costanzo, G.; Negri, R.; Di Mauro, E., A possible prebiotic synthesis of purine, adenine, cytosine, and 4 (3H)-pyrimidinone from formamide: implications for the origin of life. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2001**, *9* (5), 1249-1253.
138. Senanayake, S. D.; Idriss, H., Photocatalysis and the origin of life: synthesis of nucleoside bases from formamide on TiO₂(001) single surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (5), 1194-8.
139. Saladino, R.; Crestini, C.; Neri, V.; Brucato, J. R.; Colangeli, L.; Ciciriello, F.; Di Mauro, E.; Costanzo, G., Synthesis and degradation of nucleic Acid components by formamide and cosmic dust analogues. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2005**, *6* (8), 1368-74.
140. Beck, A. L.; Rolf; Orgel, Leslie E., Phosphorylation with inorganic phosphates at moderate temperatures. *Science* **1967**.
141. De Graaf, R.; Visscher, J.; Schwartz, A. W., Reactive phosphonic acids as prebiotic carriers of phosphorus. *Journal of Molecular Evolution* **1997**, *44* (3), 237-241.

142. Saladino, R.; Crestini, C.; Neri, V.; Ciciriello, F.; Costanzo, G.; Di Mauro, E., Origin of informational polymers: The concurrent roles of formamide and phosphates. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2006**, *7* (11), 1707-14.
143. (a) Michael P. Callahan, K. E. S., H. James Cleaves II, Josef Ruzicka, Jennifer C. Stern, Daniel P. Glavin, Christopher H. House, and Jason P. Dworkin, Carbonaceous meteorites contain a wide range of extraterrestrial nucleobases.pdf. *PNAS* **August 23, 2011**, vol. *108* (no. 34), 13995–13998; (b) Botta, O.; Bada, J. L., Extraterrestrial organic compounds in meteorites. *Surveys in Geophysics* **2002**, *23* (5), 411-467.
144. Walling, C., Fenton's reagent revisited. *Accounts of Chemical Research* **1975**, *8* (4), 125-131.
145. Robertson, M. P.; Miller, S. L., Prebiotic synthesis of 5-substituted uracils: a bridge between the RNA world and the DNA-protein world. *Science* **1995**, *268* (5211), 702.
146. Gates, K. S., An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chemical research in toxicology* **2009**, *22* (11), 1747-1760.
147. (a) Robertson, M. P.; Levy, M.; Miller, S. L., Prebiotic synthesis of diaminopyrimidine and thiocytosine. *Journal of Molecular Evolution* **1996**, *43* (6), 543-550; (b) Garrett, E. R.; Tsau, J., Solvolyses of cytosine and cytidine. *Journal of pharmaceutical sciences* **1972**, *61* (7), 1052-1061; (c) Shapiro, R., The prebiotic role of adenine: a critical analysis. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **1995**, *25* (1-3), 83-98.; (d) Shapiro, R., Prebiotic cytosine synthesis: a critical analysis and implications for the origin of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96* (8), 4396-4401.
148. (a) House, C. H.; Miller, S. L., Hydrolysis of dihydrouridine and related compounds. *Biochemistry* **1996**, *35* (1), 315-320; (b) Levy, M.; Miller, S. L., The stability of the RNA bases: implications for the origin of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95* (14), 7933-7938.
149. Sagan, C., Ultraviolet selection pressure on the earliest organisms. *Journal of theoretical biology* **1973**, *39* (1), 195-200.
150. Middleton, C. T.; de La Harpe, K.; Su, C.; Law, Y. K.; Crespo-Hernandez, C. E.; Kohler, B., DNA excited-state dynamics: from single bases to the double helix. *Annual review of physical chemistry* **2009**, *60*, 217-39.
151. Friedberg, E. C., DNA damage and repair. *Nature* **2003**, *421* (6921), 436-440.
152. (a) Legault, P.; Pardi, A., In situ probing of adenine protonation in RNA by ¹³C NMR. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116* (18), 8390-8391; (b) Marino, J. P.; Prestegard, J. H.; Crothers, D. M., Correlation of adenine H2/H8 resonances in uniformly ¹³C labeled RNAs by 2D HCCH-TOCSY: a new tool for ¹H assignment. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116* (5), 2205-2206.
153. (a) Angell, C. L., An Infrared Spectroscopic Investigation of Nucleic Acid Constituents. *J. Chem. Soc.* **1961**, 504-515; (b) van Zundert, G. C. P.; Jaqx, S.; Berden, G.; Bakker, J. M.; Kleinermaans, K.; Oomens, J.; Rijs, A. M., IR Spectroscopy of Isolated Neutral and Protonated Adenine and 9-Methyladenine. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 1921 – 1927.
154. Hamberg, M.; Zhang, L.-Y., Quantitative determination of 8-hydroxyguanine and guanine by isotope dilution mass spectrometry. *Analytical biochemistry* **1995**, *229* (2), 336-344.
155. Cohn, M.; Hu, A., Isotopic oxygen-18 shifts in phosphorus-31 NMR of adenine nucleotides synthesized with oxygen-18 in various positions. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102* (3), 913-916.
156. (¹⁵N)-Labeled Adenine Derivatives Synthesis and Studies of tautomerism by ¹⁵N NMR spectroscopy and theoretical calculations.
157. Wevers, R. A.; Engelke, U. F.; Moolenaar, S. H.; Bräutigam, C.; de Jong, J. G.; Duran, R.; de Abreu, R. A.; van Gennip, A. H., ¹H-NMR spectroscopy of body fluids: inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *Clinical chemistry* **1999**, *45* (4), 539-548.
158. (a) Kishore, A. I.; Mayer, M. R.; Prestegard, J. H., Partial ¹³C isotopic enrichment of nucleoside monophosphates: useful reporters for NMR structural studies. *Nucleic acids research* **2005**, *33* (18), e164; (b) Łomozik, L.; Jastrzab, R., Non-covalent and coordination interactions in Cu(II) systems with uridine, uridine 5'-monophosphate and triamine or tetramine as biogenic amine analogues in aqueous solutions. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2003**, *97* (2), 179-190.
159. Cardin, C. J.; Roy, A., Anticancer activity of organotin compounds. 2. Interaction of diorganotin dihalides with nucleic acid bases and nucleosides; the synthesis of adenine, adenosine and 9-methyladenine adducts. *Inorganica chimica acta* **1985**, *107* (1), 57-61.

160. Lukin, M.; de los Santos, C., NMR structures of damaged DNA. *Chemical reviews* **2006**, *106* (2), 607-686.
161. (a) Legault, P.; Farmer, B. T.; Mueller, L.; Pardi, A., Through-bond correlation of adenine protons in a ¹³C-labeled ribozyme. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116* (5), 2203-2204; (b) Bagno, A.; Rastrelli, F.; Saielli, G., Predicting the NMR spectra of nucleotides by DFT calculations: cyclic uridine monophosphate. *Magnetic resonance in chemistry : MRC* **2008**, *46* (6), 518-24.
162. (a) Carmona, P.; Huong, P.; Gredilla, E., Raman spectra and binding of Cull to purine nucleotides. *Journal of Raman spectroscopy* **1988**, *19* (5), 315-319; (b) Khalil, F. L.; Brown, T. L., Infrared spectra of adenosine triphosphate complexes in deuterium oxide solution. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86* (23), 5113-5117; (c) Xu, Z. H.; Butler, I. S., Fourier transform infrared and laser Raman microprobe spectra of uridine. *Journal of Raman spectroscopy* **1987**, *18* (5), 351-356; (d) Nishizawa, J.-i.; Sasaki, T.; Suto, K.; Tanabe, T.; Saito, K.; Yamada, T.; Kimura, T., THz transmittance measurements of nucleobases and related molecules in the 0.4- to 5.8-THz region using a GaP THz wave generator. *Optics Communications* **2005**, *246* (1-3), 229-239.
163. Srinivasan, V.; Morowitz, H. J., Analysis of the intermediary metabolism of a reductive chemoautotroph. *The Biological Bulletin* **2009**, *217* (3), 222-232.
164. Pereto, J.; Bada, J. L.; Lazcano, A., Charles Darwin and the origin of life. *Origins of life and evolution of the biosphere : the journal of the International Society for the Study of the Origin of Life* **2009**, *39* (5), 395-406.
165. Robert M. Hazen, D. P., Wouter Bleeker, Robert T. Downs, John M. Ferry, Timothy J. McCoy, Dimitri A. Sverjensky, Hexiong Yang, Mineral evolution. *American Mineralogist* **2008**, *93* ((11-12)).
166. Brearley, A.; Jones, R., Chondritic Meteorites, in "Planetary Materials", Revs. Mineralogy: 1998.
167. Weiner, S.; Dove, P. M., An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Reviews in mineralogy and geochemistry* **2003**, *54* (1), 1-29.
168. Gedulin, B.; Arrhenius, G., Sources and geochemical evolution of RNA precursor molecules: the role of phosphate. *Early life on Earth* **1994**, 90-106.
169. Handschuh, G.; Orgel, L., Struvite and prebiotic phosphorylation. *Science* **1973**, *179* (4072), 483-484.
170. Gull, M.; Pasek, M. A., Is struvite a prebiotic mineral? *Life (Basel)* **2013**, *3* (2), 321-30.
171. Schwartz, A. W., Phosphorus in prebiotic chemistry. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **2006**, *361* (1474), 1743-9; discussion 1749.
172. Arrhenius, G.; Sales, B.; Mojzsis, S.; Lee, T., Entropy and charge in molecular evolution—the case of phosphate. *Journal of theoretical biology* **1997**, *187* (4), 503-522.
173. Pasek, M. A.; Kee, T. P.; Bryant, D. E.; Pavlov, A. A.; Lunine, J. I., Production of potentially prebiotic condensed phosphates by phosphorus redox chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (41), 7918-7920.
174. Lohrmann, R.; Orgel, L., Urea-inorganic phosphate mixtures as prebiotic phosphorylating agents. *Science* **1971**, *171* (3970), 490-494.
175. Schwartz, A. W., Prebiotic phosphorylation-nucleotide synthesis with apatite. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis* **1972**, *281* (4), 477-480.
176. Pasek, M. A., Rethinking early Earth phosphorus geochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (3), 853-858.
177. Gilbert, J. S.; Lane, S. J. In *Electrical phenomena in volcanic plumes*, Volcanic ash and aviation safety: Proceedings of the first international symposium on volcanic ash and aviation safety. US Geol Surv Bull, 1994; pp 31-38.
178. Markhinin, E.; Podkletnov, N., The phenomenon of formation of prebiological compounds in volcanic processes. *Origins of life* **1977**, *8* (3), 225-235.
179. De Graaf, R.; Schwartz, A. W., Reduction and activation of phosphate on the primitive earth. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **2000**, *30* (5), 405-410.
180. Glindemann, D.; De Graaf, R.; Schwartz, A. W., Chemical reduction of phosphate on the primitive Earth. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **1999**, *29* (6), 555-561.
181. De Graaf, R.; Visscher, J.; Schwartz, A. W., A plausibly prebiotic synthesis of phosphonic acids. **1995**.

182. Yamagata, Y.; Watanabe, H.; Saitoh, M.; Namba, T., Volcanic production of polyphosphates and its relevance to prebiotic evolution. **1991**.
183. de Jager, H.-J.; Prinsloo, L. C., The Dehydration of Phosphates Monitored by DSC/TGA and In Situ Raman Spectroscopy. *Thermochimica Acta* **2001**, *376* (2), 187-196.
184. Crutchfield, M.; Callis, C.; Irani, R.; Roth, G., Phosphorus nuclear magnetic resonance studies of ortho and condensed phosphates. *Inorganic Chemistry* **1962**, *1* (4), 813-817.
185. Cade-Menun, B. J., Characterizing Phosphorus in Environmental and Agricultural Samples by ³¹P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Talanta* **2005**, *66* (2), 359-371.
186. Glonek, T.; Kopp, S. J.; Kot, E.; Pettegrew, J. W.; Harrison, W. H.; Cohen, M. M., P-31 Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Brain: The Perchloric Acid Extract Spectrum. *Journal of neurochemistry* **1982**, *39* (5), 1210-1219.
187. Tseng, Y.-H.; Zhan, J.; Lin, K. S.; Mou, C.-Y.; Chan, J. C., High resolution ³¹P NMR study of octacalcium phosphate. *Solid state nuclear magnetic resonance* **2004**, *26* (2), 99-104.
188. (a) Corbridge, D.; Lowe, E., The infra-red spectra of some inorganic phosphorus compounds. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1954**, 493-502; (b) Corbridge, D.; Lowe, E., The infra-red spectra of inorganic phosphorus compounds. Part II. Some salts of phosphorus oxy-acids. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1954**, 4555-4564; (c) Corbridge, D.; Lowe, E., Quantitative infrared analysis of condensed phosphates. *Analytical Chemistry* **1955**, *27* (9), 1383-1387.
189. (a) Lahav, N.; White, D.; Chang, S., Peptide formation in the prebiotic era: thermal condensation of glycine in fluctuating clay environments. *Science* **1978**, *201* (4350), 67-69; (b) Lambert, J.-F.; Stievano, L.; Lopes, I.; Gharsallah, M.; Piao, L., The Fate of Amino Acids Adsorbed on Mineral Matter. *Planet. Space Sci.* **2009**, *57* (4), 460-467; (c) Schreiner, E.; Nair, N. N.; Wittekindt, C.; Marx, D., Peptide synthesis in aqueous environments: The role of extreme conditions and pyrite mineral surfaces on formation and hydrolysis of peptides. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (21), 8216-8226; (d) Kawamura, K.; Takeya, H.; Kushibe, T.; Koizumi, Y., Mineral-enhanced hydrothermal oligopeptide formation at the second time scale. *Astrobiology* **2011**, *11* (5), 461-469; (e) Pant, C. K.; Lata, H.; Pathak, H. D.; Mehata, M. S., Heat-initiated prebiotic formation of peptides from glycine/aspartic acid and glycine/valine in aqueous environment and clay suspension. *International Journal of Astrobiology* **2009**, *8* (02), 107-115; (f) Teller, G.; Nakatani, Y.; Ourisson, G.; Keller, M.; Hafenbradl, D.; Stetter, K. O., A One-Step Synthesis of Squalene from Farnesol under Prebiotic Conditions. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, *34* (17), 1898-1900; (g) Désaubry, L.; Nakatani, Y.; Ourisson, G., Toward higher polyprenols under 'prebiotic' conditions. *Tetrahedron letters* **2003**, *44* (36), 6959-6961.
190. Saladino, R.; Neri, V.; Crestini, C.; Costanzo, G.; Graciotti, M.; Di Mauro, E., Synthesis and degradation of nucleic acid components by formamide and iron sulfur minerals. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (46), 15512-15518.
191. Cleaves H., J.; Scott, A. M.; Hill, F. C.; Leszczynski, J.; Sahai, N.; Hazen, R., Mineral-organic interfacial processes: potential roles in the origins of life. *Chemical Society reviews* **2012**, *41* (16), 5502-5525.
192. Mathew, D. C.; Luthey-Schulten, Z., Influence of montmorillonite on nucleotide oligomerization reactions: a molecular dynamics study. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **2010**, *40* (3), 303-317.
193. Vazquez-Mayagoitia, A.; Horton, S. R.; Sumpter, B. G.; Sponer, J.; Sponer, J. E.; Fuentes-Cabrera, M., On the Stabilization of Ribose by Silicate Minerals. *Astrobiology* **2011**, *11* (2), 115-121.
194. Ledevin, M. Les cherts Archéens de la ceinture de roches vertes de Barberton (3.5-3.2 Ga), Afrique du Sud. Processus de formation et utilisation comme proxys paleo-environnementaux. Grenoble, 2013.
195. (a) Knauth, L. P.; Lowe, D. R., Oxygen isotope geochemistry of cherts from the Onverwacht Group (3.4 billion years), Transvaal, South Africa, with implications for secular variations in the isotopic composition of cherts. *Earth and Planetary Science Letters* **1978**, *41* (2), 209-222; (b) Knauth, L. P.; Lowe, D. R., High Archean climatic temperature inferred from oxygen isotope geochemistry of cherts in the 3.5 Ga Swaziland Supergroup, South Africa. *Geological Society of America Bulletin* **2003**, *115* (5), 566-580; (c) Knauth, L. P., Temperature and salinity history of the Precambrian ocean: implications for the course of microbial evolution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **2005**, *219* (1), 53-69; (d) Paris, I.; Stanistreet, I. G.; Hughes, M. J., Cherts of the Barberton greenstone belt interpreted as products of submarine exhalative activity. *The Journal of Geology* **1985**, 111-129; (e) Marin, J.; Chaussidon, M.; Robert,

- F., Microscale oxygen isotope variations in 1.9 Ga Gunflint cherts: assessments of diagenesis effects and implications for oceanic paleotemperature reconstructions. *Geochimica et cosmochimica acta* **2010**, *74* (1), 116-130.
196. (a) van den Boorn, S. H.; van Bergen, M. J.; Nijman, W.; Vroon, P. Z., Dual role of seawater and hydrothermal fluids in Early Archean chert formation: evidence from silicon isotopes. *Geology* **2007**, *35* (10), 939-942; (b) Allwood, A. C.; Kamber, B. S.; Walter, M. R.; Burch, I. W.; Kanik, I., Trace elements record depositional history of an Early Archean stromatolitic carbonate platform. *Chemical Geology* **2010**, *270* (1), 148-163; (c) Bolhar, R.; Kamber, B. S.; Moorbath, S.; Fedo, C. M.; Whitehouse, M. J., Characterisation of early Archean chemical sediments by trace element signatures. *Earth and Planetary Science Letters* **2004**, *222* (1), 43-60.
197. (a) Sugitani, K.; Yamamoto, K.; Adachi, M.; Kawabe, I.; Sugisaki, R., Archean cherts derived from chemical, biogenic and clastic sedimentation in a shallow restricted basin: examples from the Gorge Creek Group in the Pilbara Block. *Sedimentology* **1998**, *45* (6), 1045-1062; (b) Sugitani, K.; Horiuchi, Y.; Adachi, M.; Sugisaki, R., Anomalously low Al₂O₃/TiO₂ values for Archean cherts from the Pilbara Block, Western Australia—possible evidence for extensive chemical weathering on the early earth. *Precambrian Research* **1996**, *80* (1), 49-76.
198. (a) Zhuravlev, L., The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *173* (1), 1-38; (b) Iler, R. K., *The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry*. Wiley: 1979.
199. Catlow, C.; Cormack, A., Computer modelling of silicates. *International Reviews in Physical Chemistry* **1987**, *6* (3), 227-250.
200. Maciel, G. E.; Sindorf, D. W., Silicon-29 NMR study of the surface of silica gel by cross polarization and magic-angle spinning. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102* (25), 7606-7607.
201. Aimeur, M. R.; El Kortobi, Y.; Legrand, A. P., Water adsorption on pyrogenic silica followed by 1 H MAS NMR. *Journal of colloid and interface science* **1997**, *194* (2), 434-439.

Chapitre II

Matériels et méthodes

III. Chapitre II : Matériels et méthodes

A. Préparation des échantillons

I. Les supports utilisés :

Les supports utilisés au cours de cette thèse sont de deux types : commercial (silice amorphe) et synthétique (saponite). Le support de silice utilisé est l'Aérosil 380, fourni par la société EVONIK tandis que la saponite 0,4 a été synthétisée au LAMS à partir d'hydrogels dont la composition molaire est la suivante : $1\text{SiO}_2 : 0,167 \text{ Al}_2\text{O}_3 : 1\text{MgO} : 0,167 \text{ Na}_2\text{O} : 0,05 \text{ HF} : 192\text{H}_2\text{O}$. Les sources de réactifs sont ajoutées à température ambiante et sous agitation permanente dans l'ordre suivante : H_2O , source de fluor, source de magnésium, source d'aluminium, source de sodium et source de silicium. La source de fluor est l'acide fluorhydrique, celle de silicium est l'aérosil 380, celle du magnésium l'acétate de magnésium et pour l'aluminium, l'acétate dibasique. Le mélange est agité vigoureusement entre chaque addition de réactifs. L'hydrogel mûri durant 2,5 h est transvasé dans une chemise en PTFE (polytétrafluoroéthylène), elle-même placée dans un autoclave en acier d'une capacité de 120 ml. Celui-ci est ensuite porté à 220 °C sous pression autogène. La durée de synthèse est d'une semaine. L'autoclave est refroidi à température ambiante. Le pH du liquide surnageant dans la chemise est mesuré. Le solide est ensuite séparé par filtration, lavé à l'eau distillée et séché au-dessus d'une étuve à 80 °C pendant 48 h. Le produit « brut » obtenu est placé dans un humidificateur en présence d'une solution saturée du sel NH_4Cl (humidité relative P/P0 = 0,80) durant 3 j avant d'être caractérisé.

II. Les produits chimiques utilisés

Les produits chimiques utilisés dans ce travail sont principalement fournis par Sigma-Aldrich. Le tableau II-1 regroupe tous ces produits et présente leurs formules chimiques, leurs puretés et leurs références CAS.

Tableau III-1 : Les produits organiques et les sels utilisés dans les imprégnations

Nom du produit	Formule	Pureté	Référence
D-ribose ^a	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	>99%	50-69-1
D-ribose (5*marqué) ^b	$\text{C}^*\text{H}_{10}\text{O}_5$	98%	CLM-3652-0.1
Adénine ^a	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5$	>99%	73-24-5
Adénosine ^a	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$	>99%	58-61-7

Adénosine mono-phosphate disodium ^a	$C_{10}H_{12}N_5O_7PNa_2$	>99%	4578-31-8
Uridine mono-phosphate disodium ^a	$C_9H_{11}N_2O_9PNa_2$	>99%	3387-36-8
D-Ribose 5' phosphate dissodium ^a	$C_5H_9Na_2O_8P \cdot x$ H_2O	>98%	4774244
Phosphate de potassium ^a	KH_2PO_4	>99%	7778-77-0
Chlorure de magnésium ^c	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	98%	7791-18-6
Chlorure de calcium ^a	$CaCl_2$	>97%	10043-52-4
Chlorure de zinc ^a	$ZnCl_2$	98%	7646-85-7
Chlorure de fer (II) ^a	$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	>99%	13478-10-9
Chlorure de fer (III) ^a	$FeCl_3$	97%	7705-08-0
Chlorure de cuivre (II) ^a	$CuCl_2 \cdot 4H_2O$	>99%	10125-13-0
Chlorure de strontium ^a	$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	>99%	10025-70-4
Oxyde de deutérium ^a	D_2O	99,9%	7789-20-0
^a fourni par Sigma-Aldrich ^b fourni par Cambridge Isotope Laboratory ^c fourni par ProLabo			

III. Adsorption et traitement des échantillons

III.1 Imprégnation à humidité naissante (IHN)

Les échantillons ont été préparés par imprégnation humidité naissante (IHN). Cette méthode consiste à solubiliser les produits dans un volume minimum d'eau permettant d'imprégner la porosité du support (consistance pâteuse) sans qu'il y ait formation d'une phase liquide séparée. La quantité d'eau ajoutée dépend donc de la nature du support utilisé : par exemple pour 300mg de support on utilise 5 ml d'eau dans le cas de l'Aerosil et 1,5 ml d'eau dans le cas de la saponite. Cependant, l'adénine et l'adénosine ne sont pas très solubles dans l'eau ce qui nous a obligé d'augmenter le volume de solution à 10ml : on parle dans ce cas d'imprégnation avec excès de solution.

Une fois que les produits sont solubilisés dans l'eau, on laisse tomber goutte à goutte la solution de façon à mouiller le support sans qu'il y ait formation d'une phase liquide nettement séparé du solide (sauf en cas où on a de l'adénine ou adénosine). La pâte formée est mise à sécher à l'étuve à 70°C. Comme il n'y a pas d'étape de séparation, les échantillons solides ainsi préparés contiennent la quantité totale de réactifs introduite.

Le tableau II-2 donne la liste des échantillons qui ont été synthétisés et caractérisés lors du présent travail. Les échantillons de ribose + sels minéraux sur silice sont identifiés par une "nomenclature longue" (p. ex. Ribose-Mg (2 :1) /SiO₂), celle qui a été utilisée dans l'article publié. Pour les autres, afin d'éviter l'usage de noms trop longs, nous avons choisi une "nomenclature abrégée" : par exemple " AR2P / SiO₂" désigne un échantillon contenant de l'adénine, du ribose en rapport molaire (1 :1), et du phosphate en rapport molaire (1 :2), supportés sur silice.

Tableau III-2 : La liste des échantillons étudiés dans ce travail et leur composition

	Nom de l'échantillon	Charge en ribose, % (ou rapport molaire)	Charge en phosphate, % (ou rapport molaire)	Charge en adénine, % (ou rapport molaire)	Sels
Silice	X% Pi/SiO ₂	---	X%	---	---
	X% Pi/SiO ₂ , 130°C	---	X%	---	---
	10% Pi/SiO ₂	---	10%	---	---
	x% Ribose/SiO ₂	x%	---	---	---
	Ribose-Mg (1 :1) /SiO ₂	10%	---	---	1 ; MgCl ₂
	Ribose-Mg (2 :1) /SiO ₂	10%	---	---	2 ; MgCl ₂
	Ribose-Ca (1 :1) /SiO ₂	10%	---	---	1 ; CaCl ₂
	Ribose-Ca (2 :1) /SiO ₂	10%	---	---	2 ; CaCl ₂
	Ribose-Zn (1 :1) /SiO ₂	10%	---	---	1 ; ZnCl ₂
	Ribose-Zn (2 :1) /SiO ₂	10%	---	---	2 ; ZnCl ₂
	Ribose-Sr (1 :1) /SiO ₂	10%	---	---	1 ; SrCl ₂
	Ribose-Sr (2 :1) /SiO ₂	10%	---	---	2 ; SrCl ₂
	Ribose-Cu (1 :1) /SiO ₂	10%	---	---	1 ; CuCl ₂
	Ribose-Cu (2 :1) /SiO ₂	10%	---	---	2 ; CuCl ₂
	Ribose-Fe ²⁺ (1 :1) /SiO ₂	10%	---	---	1 ; FeCl ₂
	Ribose- Fe ²⁺ (2 :1) /SiO ₂	10%	---	---	2 ; FeCl ₂

Ribose-Fe ³⁺ (1 :1) /SiO ₂	10%	---	---	1 ; FeCl ₃
Ribose- Fe ³⁺ (2 :1) /SiO ₂	10%	---	---	2 ; FeCl ₃
3%Rib 1P/ SiO ₂	3%	1	---	---
5%Rib1P1/ SiO ₂	5%	1	---	---
3%Rib 2P/ SiO ₂	3%	2	---	---
5%Rib2P/ SiO ₂	5%	2	---	---
3%Rib 1P/SiO ₂ ,130°C	3%	1	---	---
5%Rib1P/ SiO ₂ ,130°C	5%	1	---	---
3%Rib2P/ SiO ₂ ,130°C	3%	2	---	---
5%Rib2P/ SiO ₂ ,130°C	5%	2	---	---
3%Rib2P/ SiO ₂ ,130°C, H/S ^a	3%	2	---	---
Ribose/(10% Pi / SiO ₂ , 200°C) ^e	Adsorption de 1 équ. Molaire de ribose sur l'échantillon de 10% Pi/SiO ₂ , 200°C, 24h			
(10% Pi-SiO ₂ , 200°C, hydr)	10% Pi/SiO ₂ , 200°C, 24h puis hydrolysé avec la moindre quantité d'eau			
AR / SiO ₂	1	---	3%	---
AR1P / SiO ₂	1	1	3%	---
AR2P / SiO ₂	1	2	3%	---
AR2P / SiO _{2,p} ^b	1	1	3%	---
AR2P / SiO _{2,m} ^c	1	2	3%	---
AR*2P / SiO _{2,p} ^{db}	1	1	3%	---
AR*2P / SiO _{2,m} ^{dc}	1	2	3%	---
5%AMP/SiO ₂	5% AMPNa ₂ adsorbé par IHN sur la silice			
5%UMP/SiO ₂	5% UMPNa ₂ adsorbé par IHN sur la silice			
5% AMP :UMP, (1 :1)/SiO ₂	5% AMPNa ₂ + 1 équiv.molaire UMPNa ₂ co-adsorbé par IHN sur la surface de la silice.			

	5% AMP :UMP, (1 :1)/SiO ₂ , 100°C/3h	5% AMPNa ₂ + 1 équiv.molaire UMPNa ₂ co-adsorbé par IHN sur la surface de la silice.			
	5% AMP :UMP, (1 :1)/SiO ₂ , 180°C/3h	5% AMPNa ₂ + 1 équiv.molaire UMPNa ₂ co-adsorbé par IHN sur la surface de la silice.			
	5% A /SiO ₂	5% adénine adsorbé par IHN sur la surface de la silice			
	5%Ads/SiO ₂	5% adénosine adsorbé par IHN sur la surface de la silice			
Saponite	x%Pi/sap	X%	---	---	---
	5%Pi/sap, 100°C/3h	5%	---	---	---
	x% ribose/sap	---	X%	---	---
	5%Rib + Pi (1 :1) / sap	1	5%	---	---
	5%Rib + Pi (1 :1) / sap, 100°C/3h	1	5%	---	---
	AR1Pi/sap	1	1	3%	---
	5% A/sap	---	---	5%	---
	5%Ads/sap	5% adénosine adsorbé par IHN sur la saponite			
	5%AMP/sap	5% AMPNa ₂ adsorbé par IHN sur la saponite			

a : soumis à un cycle hydrolyse/séchage ; b : la fraction précipitée ; c : la fraction majoritaire ; d : ribose marqué 5(¹³C) ; e : adsorption successive

Vert : séché à 70°C, marron : activé à 130°C/3h ; violet : activé à 100°C/3h, orange : activé à 180°C/3h, rouge : 200°C, 24h

i. b, c, d: signification

Les échantillons de glycosylation en présence de phosphates ont été préparés par co-adsorption IHN des trois composants (ribose, adénine et Pi) sur la surface de la silice. Dans un premier temps, on a préparé un échantillon avec 3% ribose, 1 équivalent molaire d'adénine et 1 équivalent molaire de Pi (AR1P-SiO₂). Puis on l'a analysé à Ta et après activation à 100°C. Ensuite, on a étudié l'effet de la charge en phosphate sur le rendement de la réaction. Pour cela, on a préparé un échantillon avec 2 équivalents molaires en Pi. Cependant, on a alors remarqué la présence de deux phases différentes. Un solide jaune est déposé sur la paroi du bécher, probablement suite à une séparation d'une partie de la solution aqueuse par capillarité, tandis que le fond du bécher contient un solide blanc.

On a séparé les deux phases et on les a analysés chacune à part. Ces échantillons sont nommés AR2P_p-SiO₂ (la partie précipitée sur la paroi) et AR2P_m-SiO₂ (la partie majoritaire qui se trouve au fond du bécher). D'autre part, on a répété cette synthèse en utilisant du ribose marqué dans le but d'améliorer la sensibilité de l'analyse ¹³C CP et de tenter la RMN 2D ¹³C-³¹P. L'échantillon préparé contient 3% ribose, 1 équivalent molaire d'adénine et le double en Pi. De même, on a obtenu deux phases qu'on les a nommés AR_m2P_p-SiO₂ (précipité) et AR_m2P_m-SiO₂ (massive). Ces deux phases ont été analysées par DRX, ³¹P RMN (1pulse, CP), SM en mode MALDI et RMN CP-MAS de ¹³C.

ii. e : signification

A l'exception de l'échantillon de Ribose/ (10%Pi/SiO₂, 200°C), tous les échantillons étudiés dans ce travail ont été préparés par co-adsorption IHN des réactifs sur le support. Cependant, avec cet échantillon on a adsorbé successivement les réactifs. D'abord, on a adsorbé le phosphate sur la surface de la silice. Puis, on a activé l'échantillon à 200°C, 24h afin de produire des polyphosphates. Ensuite, on a adsorbé le ribose avec la moindre quantité d'eau permettant d'hydrater toute la poudre.

III.II Activation thermique sous flux d'air

Les échantillons solides collectés après séchage sont chauffés dans une cellule de calcination sous flux gazeux (air sec) de débit 5mL /min jusqu'à 130° ou 100°C selon les cas avec une rampe de montée en température de 5°/min et un plateau de 3h à la température finale.

III.III Cycle d'hydratation séchage

Pour l'échantillon (3%R1P / SiO₂) préparé par IHN et activé à 130°C/3h, nous avons étudié l'effet d'un cycle hydratation-séchage. Ce dernier a été réalisé comme suit : l'échantillon est d'abord préparé par IHN et activé dans le four de calcination à 130°C/3h, puis réhydraté avec de l'eau distillée en quantité juste suffisante pour mouiller la poudre de silice. Ensuite l'échantillon hydraté est placé à l'étuve à 70°C pendant 24 heures.

III.IV Désorption de la surface minérale

La spectroscopie de masse MALDI ne peut pas être appliquée in situ aux échantillons solides. Elle nécessite une étape de désorption. Pour cela tous les échantillons analysés en MALDI ont subi une étape de désorption qui dépend de la nature de support utilisé. Pour les systèmes sur support silice (Aérosil), la désorption est réalisée par mise en suspension du solide dans l'eau distillée 60 ml /g de silice suivi d'une agitation de 15 minutes. Le solide est séparé du filtrat par centrifugation du mélange à une vitesse de 6000 trs/min Le filtrat est ensuite analysé. On

peut vérifier que la désorption est totale par analyse thermogravimétrique : la courbe TG de la phase solide récupérée ne montre plus de signaux attribuables à des molécules organiques supportées.

Pour la saponite, la désorption s'effectue avec une solution $10^{-2}M$ de chlorure de calcium en agitant une suspension de 16,6 mg de saponite /ml de $CaCl_2$ pendant 15 min. Le filtrat est récupéré après centrifugation (6000 tr/min).

B. Analyse thermogravimétrique

I. Principe

L'analyse thermogravimétrique (ATG), en anglais *thermogravimetric analysis* (TGA), est une balance de haute précision qui permet de suivre la variation de masse d'un échantillon en fonction du temps ou de la température dans une atmosphère contrôlée. Cette technique peut aussi être couplée avec d'autres méthodes d'analyse comme la spectrométrie de masse, la colorimétrie, ...

II. Type d'information

En général, l'ATG-TD nous renseigne sur tous les phénomènes impliquant une perte de masse (ATG) ainsi que sur la nature thermodynamique de la réaction (endothermique ou exothermique) par ATD ou analyse thermique différentielle entre l'échantillon et le milieu.

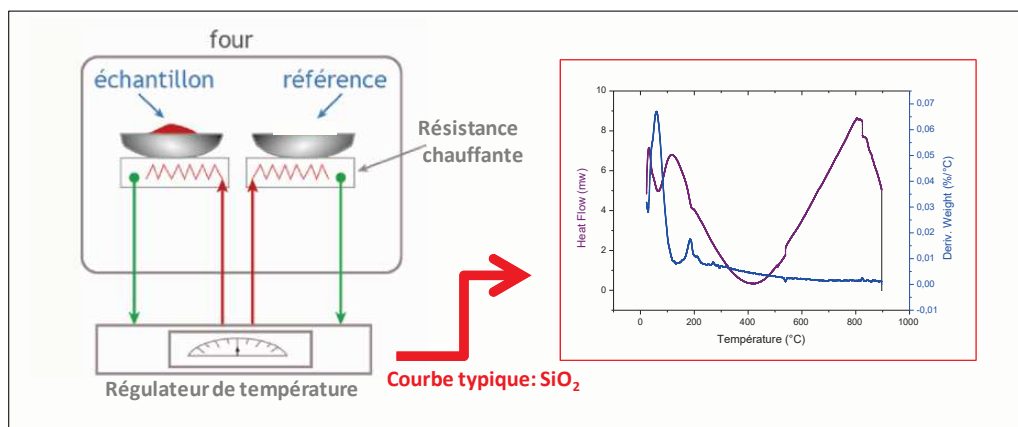


Figure III-1 : Exemple d'une analyse ATG-ATD (droite). Schéma de fonctionnement de l'ATG (gauche)

Le résultat obtenu peut être présenté, comme le montre la figure II-1, par deux courbes : la dérivée de la masse de l'échantillon (en $mg/°C$ ou $\%masse/°C$) et le flux de chaleur (Heat flow en milliwatt) en fonction de la température ($°C$). La courbe DTG nous permet de déterminer les températures auxquelles l'échantillon est soumis à une perte de masse. D'autre part, la courbe de flux de chaleur indique la nature endothermique, exothermique ou athermique des événements qui surviennent lors du chauffage.

Cette méthode nous a notamment permis de quantifier la matière organique présente dans nos échantillons par intégration des pics DTG et correction par rapport au support utilisé. Ainsi, elle nous a guidé sur la nature des réactions chimiques qui ont eu lieu sur le support et elle nous a indiqué les températures auxquelles la matière supportée est soumise à des transformations (oxydation de la matière organique, condensations).

III. Appareillage et conditions opératoires

L'appareil ATG-TD utilisé est de type (SDT Q 600 TA). Les mesures ont été effectuées entre Ta et 800°C sous flux d'air sec industriel (100ml/min) et avec une montée linéaire de température de 5°C/min. L'échantillon doit être introduit dans le four sous forme d'une poudre fine. Le four contient une microbalance formée de deux porte - échantillons (creusets en alumine), dans le premier on ajoute l'échantillon alors que le deuxième reste vide et sert de référence. Une fois introduit l'échantillon, on ferme le four pour que l'appareil soit hermétique et on lance le programme de chauffage et d'analyse.

IV. Inconvénients de cette méthode

C'est une méthode d'analyse destructive qui provoque la perte de l'échantillon contrairement à la DRX et à la RMN. De plus, elle n'était pas sensible aux échantillons contenant un pourcentage massique inférieur à 3%.

C. Diffraction des Rayons X (DRX)

I. Principe

C'est une méthode d'analyse basée sur la diffraction d'un faisceau monochromatique de rayons X sur les plans formés par des atomes agencés de façon périodique, ce qui signifie que la technique ne détectera que les phases cristallines. L'intensité des rayons diffractés est collectée en fonction de l'angle de déviation 2θ du faisceau. Pour mieux expliquer ce phénomène, un schéma 2D est proposé dans la figure III-2.

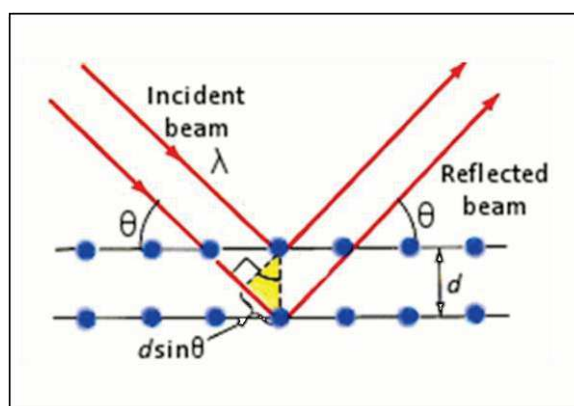


Figure III-2 : Principe de la diffraction rayons X

Selon l'équation de Bragg, l'angle mesuré est associé à la distance réticulaire entre les deux plans :

$$2d_{hkl} \sin \theta_{hkl} = n * \lambda$$

- d_{hkl} = distance inter-réticulaire, c'est-à-dire distance entre deux plans cristallographiques de la même famille ;
- θ_{hkl} = demi-angle de déviation (moitié de l'angle entre le faisceau incident et la direction du détecteur) ;
- n = ordre de réflexion = 1 sur les diffractomètres que nous utilisons ;
- λ = longueur d'onde des rayons X, nous utilisons la raie $K\alpha$ d'une anti-cathode au cuivre, donc $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$.

II. Type d'information

La diffraction de rayons X nous a permis d'identifier les phases cristallines, à partir de la position des pics obtenus par rapport aux références rapportées par la bibliographie (phosphate massique, adénine, adénosine, AMP, sels métalliques ...) : il s'agit donc d'une approche « empreinte digitale » destinée à identifier d'éventuelles phases cristallines. Les phases amorphes sont invisibles par cette technique (la silice amorphe est toutefois caractérisée par une bande large de diffusion).

Dans le cas des argiles, la valeur de la distance inter-réticulaire (d_{001}) nous a aidés à déterminer l'espacement interfoliaire et par la suite on a pu détecter tout écartement ou rétrécissement qui a eu lieu lors de l'adsorption des molécules.

III. Appareillage et conditions opératoires

Les analyses ont été effectuées par un diffractomètre Brucker D8 Advanced pourvu d'un détecteur linéaire Lynxeye (raie $K\alpha$ du cuivre, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, tension d'accélération 30 KV), pour 2θ entre 5 et 90° par pas de 0,02°. La poudre est aplanie dans la cavité centrale d'un disque de pyrex.

D. Résonance Magnétique nucléaire (RMN)

I. Principe

1.1 RMN 1D

Le phénomène de résonance magnétique nucléaire a été découvert en 1938. Ce phénomène dépend de l'existence d'une propriété quantique du noyau, le nombre de spin. En effet, chaque noyau possède un spin I auquel est associé un nombre quantique I appelé nombre de spin. La valeur de spin nucléaire dépend du nombre de masse A et de la charge Z du noyau considéré puisqu'elle est imposée par le nombre relatif de protons et de neutrons qui sont tous deux dotés d'un spin $I = 1/2$. Au moment de spin nucléaire I est associé un moment magnétique μ qui lui est colinéaire :

$$\mu = \gamma (h / 2\pi) I$$

où γ est le rapport gyromagnétique caractéristique de l'élément considéré et h la constante de Planck ($6,62.10^{-34} \text{J.s}$).

Lorsque l'échantillon solide est placé dans un champ magnétique \mathbf{B}_0 , tous les noyaux de spin I non nuls sont soumis à diverses interactions d'intensité variable (interaction Zeeman, interaction de déplacement chimique, interaction dipolaire, interaction de couplage scalaire, éventuellement interaction quadripolaire si $I > 1/2$) et s'orientent par rapport au champ magnétique. Le spin peut s'orienter soit parallèlement (état le plus stable, correspondant au nombre quantique de spin, $m_I = +1/2$), soit antiparallèle (état le moins stable, $m_I = -1/2$) au champ magnétique. Ce phénomène, appelé effet Zeeman nucléaire, est à la base de la spectroscopie RMN.

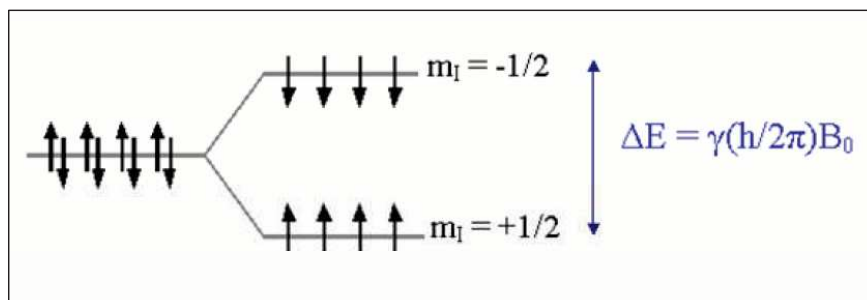


Figure III-3 : Effet Zeeman nucléaire pour un spin en présence d'un champ B_0

L'application d'une radiation électromagnétique de fréquence ν_0 correspond à $\Delta E = h \nu_0$ soit $\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$, peut entraîner une transition entre ces deux niveaux énergétiques. La fréquence à laquelle aura lieu la transition (fréquence de Larmor) va dépendre à la fois du champ

magnétique appliqué et du rapport gyromagnétique de l'élément considéré : une impulsion carrée très courte est envoyée à la fréquence de Larmor, puis la réponse de l'échantillon est enregistrée (émission électromagnétique en fonction du temps) : c'est le signal de précession libre ou FID (free induction decay).

Si on impose un champ magnétique radiofréquence B_1 , perpendiculaire à B_0 , l'aimantation macroscopique M des spins nucléaires s'écartera de l'axe z . Après interruption de cette impulsion, l'aimantation est alors animée d'un mouvement de précession autour de l'axe z selon la fréquence de Larmor (ν_0). On mesure la composante de l'aimantation dans le plan (x,y) ; ce signal est maximum lorsque l'aimantation a basculé d'un angle $\pi/2$ par rapport à l'axe z .

La transformée de Fourier du FID fournira le spectre de fréquence, indiquant les fréquences de résonance des divers noyaux présents dans l'échantillon. Comme le nuage électronique écran le champ B_0 , la fréquence n'est plus ν_0 , caractéristique du noyau nu ; la différence de fréquence est due à l'environnement chimique de chaque noyau, et se traduit par l'observation du déplacement chimique δ .

Le phénomène de relaxation induisant la disparition du signal dans le plan (x,y) est appelé relaxation transversale (spin-spin) et le temps de relaxation correspondant notée T_2 . Le phénomène conduisant à la réapparition de l'aimantation selon l'axe z est appelé relaxation longitudinale (spin-réseau) et le temps de relaxation est noté T_1 .

i. Rotation à l'angle magique (MAS)

Pour obtenir de spectres résolus en RMN du solide, on utilise la technique MAS (Magic Angle Spinning), qui repose sur la rotation de l'échantillon autour d'un axe faisant un angle dit « magique » de $\theta = 54,74^\circ$ par rapport au champ statique B^0 .

Dans un liquide, les molécules sont constamment en mouvement et leurs interactions avec les molécules voisines sont naturellement moyennées (mouvement Brownien) et ne gênent pas l'observation du signal RMN du noyau. Dans un solide, ces interactions ne sont pas moyennées par le mouvement des molécules ; le signal observé sur un solide en poudre statique montre des pics très larges, dus aux interactions anisotropiques dans les particules orientées de façon aléatoire.

La technique MAS permet, en faisant tourner l'échantillon sur lui-même à très haute vitesse (jusqu'à 14 kHz) et en l'inclinant de cet angle « magique », de moyenniser une partie de ces interactions et d'observer le spectre RMN du noyau étudié comme si on travaillait sur un

échantillon liquide. Cette valeur particulière de l'angle de θ annule la fonction $(3\cos^2 \theta - 1)$ dont dépendent les interactions dipôle-dipôle.

Au cours de notre étude, nous nous sommes uniquement intéressés à des noyaux de spin 1/2 : le carbone-13, ^{13}C , le phosphore-31, ^{31}P , et (très peu) le proton ^1H . Contrairement aux protons et au phosphore-31, le carbone-13 se caractérise par une faible abondance naturelle (1,1%), ainsi que par un rapport gyromagnétique modéré qui contribuent à sa faible sensibilité. Pour augmenter cette sensibilité, les spectres peuvent être enregistrés en utilisant, entre autres, la technique de polarisation croisée (cross polarisation ou CP).

ii. Polarisation croisée (CP)

La technique de CP (pour Cross Polarisation) réalise un transfert de polarisation des noyaux d'hydrogène (spins abondants) aux noyaux de carbone-13 (spins rares) par l'intermédiaire de l'interaction dipolaire I-S, permettant d'observer avec plus ou moins d'intensité les noyaux ^{13}C en fonction de leur environnement en hydrogène, et d'accumuler rapidement les signaux sans être limité par les temps de relaxation plus longs des noyaux ^{13}C .

Ce sont les temps de relaxation des protons qui gèrent l'intervalle de temps entre les impulsions. Comme ces derniers sont généralement beaucoup plus courts que ceux des ^{13}C , le gain de temps est considérable. Il devient alors possible de multiplier le nombre d'acquisitions et d'améliorer ainsi de façon remarquable le rapport signal sur bruit.

Cette technique améliore aussi la sensibilité car la différence de population entre les niveaux magnétiques de l'hydrogène est supérieure à celle entre les niveaux du ^{13}C . En fait, dans un cas optimal, l'aimantation maximale transférée par les protons vers le noyau S est multipliée par le facteur γ_I/γ_S (environ 4 dans notre cas).

La séquence de polarisation croisée consiste à basculer l'aimantation des spins abondants I de 90° . Les spins abondants I se trouvent ainsi verrouillés par l'application d'un champ B^1_I parallèlement à l'aimantation (« spin-lock »). Ensuite on laisse s'opérer le transfert d'aimantation pendant une durée t_c appelée temps de contact.

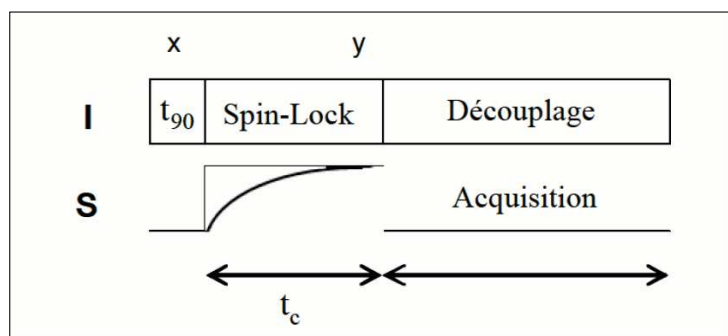


Figure III-4 : Schéma de la séquence de Polarisation Croisée (CP)

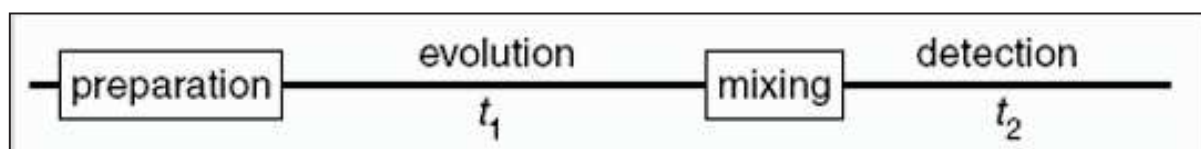
I.II RMN 2D

Les valeurs des déplacements chimiques d'un noyau fournissent des informations centrées sur l'atome, en termes de nombre et nature des plus proches voisins. La détection des couplages apporte des données structurales complémentaires sous forme de relations de proximité entre atomes, ces derniers étant identifiés par leur déplacement chimique. Même si des méthodes expérimentales en RMN 1D ont été utilisées pour accéder aux relations de proximité, elles sont à l'usage d'un emploi fastidieux et d'une efficacité parfois limitée. La détection simultanée de tous les couplages est le but de la RMN 2D de corrélation des déplacements chimiques. Les couplages observables sont de deux natures différentes : scalaires, il s'agit du couplage indirect qui a pour origine les interactions entre spins nucléaires et spins électroniques et dipolaires qui consistent en un couplage direct à travers l'espace entre spins nucléaires. L'intensité de ce dernier dépend de la distance d qui sépare les deux noyaux couplés.

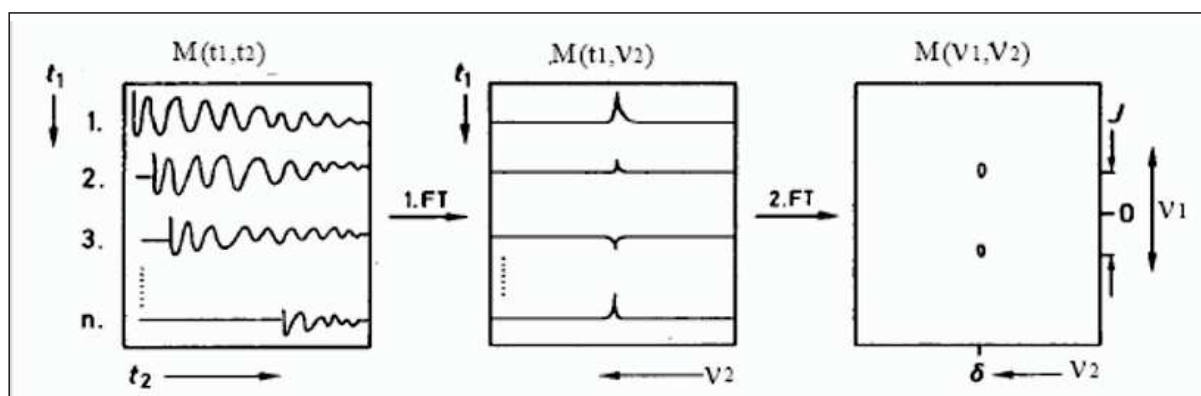
L'acquisition d'un spectre RMN 2D se fait à partir d'une séquence d'impulsion constituée de trois intervalles de temps distincts et d'une phase de mélange.

On distingue :

- 1- Un temps de préparation pendant lequel on prépare le spin à étudier.
- 2- Un temps d'évolution t_1 pendant lequel on laisse le spin évoluer vers sa position d'équilibre, suivi d'une phase de mélange rapide.
- 3- Un temps de détection t_2 pendant lequel on enregistre l'évolution de l'aimantation.



En effet, on enregistre un spectre à chaque valeur de t_1 . Ainsi, l'aimantation dépend des deux temps t_1 et t_2 , soit $M(t_1, t_2)$. La transformée de Fourier par rapport à t_2 donne un spectre $M(t_1, \nu_2)$. Ce spectre va dépendre de t_1 .



En enregistrant les spectres à différents temps t_1 , on peut également en réaliser la transformée de Fourier et obtenir un spectre 2D représentant $M(\nu_1, \nu_2)$.

II. Type d'information

La séquence 1 pulse de la RMN ^{31}P 1D nous a permis de déterminer les différents environnements de phosphore et leurs pourcentages relatifs dans les échantillons analysés. En comparant ces spectres avec ceux des références analysées dans les mêmes conditions, on a pu déterminer la nature de différents environnements détectés. Dans une étape ultérieure, l'analyse en CP a pu apporter des informations supplémentaires pour déterminer l'état de protonation de chacun de ces environnements. En passant à la RMN 2D (^1H , ^{31}P), l'image est devenue encore plus claire et on a pu déterminer les corrélations de phosphores avec tous les protons voisins.

D'autre part, les analyses RMN du carbone ont été effectuées seulement par polarisation croisée. Ceci nous a permis pas seulement de déterminer les différents environnements de carbone présents mais aussi d'évaluer de manière relative les rapports anomériques de ribose (α , β - ribofuranose et α , β - ribopyranose). Des essais RMN 2D (^{31}P , ^{13}C) ont été effectués afin de déterminer les sites de phosphorylation mais sans succès.

III. Appareillage et conditions opératoires

La calibration des valeurs de déplacement chimique de ^1H et ^{13}C a été effectuée avec l'adamantane. Ce dernier est un composé moléculaire de formule chimique $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$, il est formé de 4 cyclohexanes fusionnés ensemble en conformation de "chaise. Ainsi, on a utilisé l'acide phosphorique comme référence spectrale de phosphore.

Tableau III-3 : Les caractéristiques des noyaux étudiés et les références utilisés en RMN de solide.

Noyau	Spin	Abondance naturelle %	Rapport gyromagnétique ($10^6 \text{ rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$)	Référence
^{13}C	$\frac{1}{2}$	1,108	67,262	Adamantane
^1H	$\frac{1}{2}$	99,95	267,513	Adamantane
^{31}P	$\frac{1}{2}$	100	108,291	Acide phosphorique

Les spectres ^{13}C RMN ont été enregistrés en rotation à l'angle magique (MAS) en utilisant une séquence de polarisation croisée (CP). Un découplage spinal 64 du proton a été appliqué, le temps de recyclage est de 10 s pour le ribose massique et d'une seconde pour les échantillons adsorbés. Le temps de contact est de 1 ms. Les expériences RMN du phosphore ont été enregistrées en utilisant deux séquences différentes. La séquence 90° pulse impliquant une impulsion de longueur de 2 μs avec un temps de recyclage de 5s et la séquence CP utilisant un temps de contact de 2 ms et un temps de recyclage de 5s.

D'autre part avec la RMN HETCOR 2D (^1H , ^{31}P) on a appliqué un temps de contact de 2 ms avec un temps de recyclage de 3 sec, un incrément TD (F1) égal à 120 rangés et en appliquant 224 scans.

E. Spectroscopie MALDI

I. Principe

La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) est un mode de production d'ions pour la spectroscopie de masse (SM) dérivé de l'analyse de surface au moyen d'un faisceau laser, appelée désorption/ionisation laser. Le composé organique déposé sur le porte-échantillon absorbe les photons du laser (bande d'absorption à la longueur d'onde du laser λ). L'énergie absorbée se relaxe en éjectant sous vide des particules chargées (électrons, ions positifs et négatifs) ou neutres. L'analyse par spectrométrie de masse des ions ainsi produits permet de caractériser la nature de la surface.

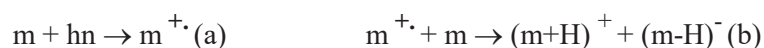
On utilise ce phénomène en MALDI : les biomolécules à analyser sont incorporées dans des cristaux de "matrice" formée de petites molécules organiques absorbant à la longueur d'onde du laser (c'est à dire que la molécule de matrice est ajoutée à la solution à analyser, puis les deux sont coprécipités par évaporation de la phase liquide). La longueur d'onde du laser est choisie de façon à ce que les biomolécules n'absorbent pas les photons laser mais seulement la matrice. Lors de l'absorption d'énergie, les biomolécules ne participent pas à la relaxation

de l'énergie. Toutefois elles sont entraînées lors de l'éjection de la matrice. Des mécanismes complexes de transfert de protons entre les molécules de matrice et les biomolécules permettent une protonation des biomolécules intactes et donc leur étude dans un analyseur de masse.

II. Mécanismes physico-chimiques conduisant à la production d'ions

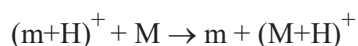
En désorption/ionisation laser assistées par matrice, le phénomène final consiste en l'éjection et l'ionisation de biomolécules sous l'impact d'une impulsion laser UV courte (~nanoseconde). Cette source d'ion est donc pulsée et non continue. Les mécanismes physico-chimiques conduisant à cette production d'ions ne sont pas encore connus avec précision. Les grandes lignes sont les suivantes :

- ❖ Absorption des photons UV par les molécules de matrice m . Certaines molécules de matrice peuvent être ionisées par un processus de mise en commun d'énergie (m^+ puis mH^+).
- ❖ Excitation rapide de ces molécules sur une faible profondeur (de l'ordre du μm) conduisant au développement d'une onde de pression dans le matériau. En remontant vers la surface, cette onde conduit à l'éjection d'un plumeau de matière (ablation).
- ❖ Dans ce plumeau de matière éjectée, des agrégats composés de molécules de matrice (neutres et ionisées sous forme protonée mH^+) et de biomolécules M , des transferts de proton peuvent se produire conduisant à la formation de biomolécules protonées MH^+ . Ce transfert de proton nécessite que l'affinité protonique de la biomolécule soit supérieure à celle de la matrice. La désolvatation progressive de ces agrégats avec perte de molécules de matrice conduit ultérieurement à des biomolécules possédant un proton, voire plusieurs protons.
- ❖ Existence d'une valeur de seuil de l'énergie laser (fluence) pour la production d'ions. Au-delà de ce seuil, la production d'ions augmente suivant une loi de puissance.
- ❖ Le nombre d'ions générés par un seul tir laser est en général insuffisant pour l'obtention d'un signal ionique correct reflétant la distribution isotopique. Il est donc nécessaire de sommer ou moyennner les signaux issus d'un grand nombre de tirs laser (d'une dizaine à plusieurs centaines).



Le transfert de proton de la matrice vers la molécule de protéine ou de peptide s'effectue selon les 2 modèles existant soit en phase gazeuse dans le plumeau de matière éjecté (réaction

molécule-ion) soit lors de l'éjection d'agrégats matrice molécule (Electrospray and MALDI Mass Spectrometry, Edited by R Cole, 2nd Edition 2010 Wiley).



L'affinité protonique de la matrice (<200 kcal/mol) étant toujours < à celle des protéines et peptides (~230 kcal/mol) le transfert de proton vers la biomolécule est favorisé.

III. Spectromètre MALDI-TOF : Appareillage et conditions opératoire

Les spectres MALDI (mode positif et négatif) sont enregistrés sur un spectromètre 4700 Proteomics Analyser ABI SCIEX. L'énergie laser est ajustée un peu au-dessus du seuil de production des ions de façon à produire les ions de produit attendus (monomères, dimères trimères sous forme linéaire et/ou cyclique) en évitant une saturation du détecteur par les ions de matrice (HCCA). Les spectres sont étalonnés de façon interne (à partir des pics mono-isotopiques des ions mH^+ et $2mH^+$ de la matrice) ou de façon externe sur un échantillon voisin contenant un mélange de produits connus (AMP, Adénine, Adénosine).

La production d'ions en MALDI nécessite en premier lieu des molécules de matrice absorbant à la longueur d'onde du laser ($\lambda = 355$ nm (NdYAG) ou 337 nm (laser N_2)), HCCA est la matrice utilisée dans notre travail.

La réalisation de cible en MALDI consiste à mélanger un petit volume v d'une solution diluée du produit d'intérêt avec un volume v' de la matrice (concentrée). Matrice et biomolécules doivent posséder des solvants communs. Un très faible volume ($\leq 1\mu\text{l}$) est alors déposé sur un support métallique. L'évaporation progressive du solvant (typiquement acétonitrile : H_2O 50 :50 contenant 0,1%TFA) conduit à la formation de micro-cristaux à l'intérieur desquels les biomolécules sont incluses.

Dans ce travail, le rapport du mélange matrice (HCCA) –solution est $1\mu\text{L}$ de HCCA (8 mg/ml) avec $\sim 1\mu\text{L}$ du filtrat de la solution désorbée.

Le logiciel Data Explorer version 4.6 est utilisé pour l'analyse des spectres MS.

Afin de pouvoir calculer les rendements de la formation d'adénosine dans les différentes conditions expérimentales étudiées dans la partie glycosylation, on a analysé une solution équimolaire d'adénosine et d'adénine en MALDI. Le spectre obtenu présente, en plus des pics de la matrice, deux pics d'intensités presque égale à 100%. Ces deux pics sont respectivement caractéristiques d'adénine ($MH^+ = 136,0$ uma) et d'adénosine ($MH^+ = 268,0$). Ce résultat indique que les deux produits présentent le même facteur de réponse en spectrométrie de

masse MALDI ce qui rend possible le calcul de rendement. Le spectre obtenu est présenté ci-dessous.

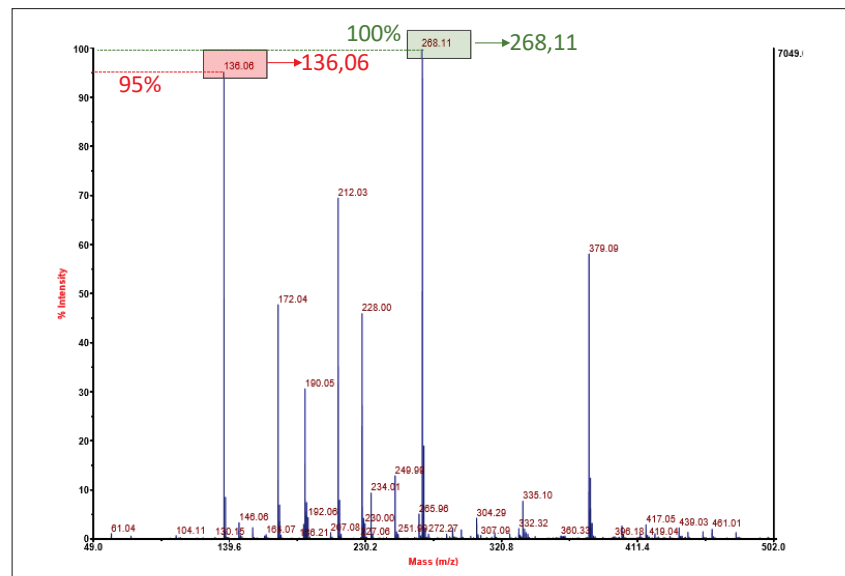


Figure III-5 : Analyse MALDI d'une solution équimolaire d'adénine-adénosine.

Cependant, nous n'avons pas passé une solution équimolaire contenant l'AMP ce qui nous empêche de calculer son rendement de formation dans notre étude.

F. Analyse Infrarouge FTIR :

I. Principe

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est une technique d'analyse basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection de certaines vibrations de déterminer les fonctions chimiques présentes dans le matériau. Lorsque l'énergie apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchiée ou transmise. Le domaine IR entre 4000 et 400 cm^{-1} correspond au domaine d'énergie de vibrations des molécules.

Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. Pour une géométrie donnée, on peut déterminer les modes de vibrations actifs en infrarouge grâce à la théorie des groupes.

La position des bandes d'absorption va dépendre en particulier de la force de liaison et de la masse. Par conséquent à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant de l'identifier.

Un spectromètre FTIR comporte principalement 5 parties, comme le montre la figure (III-6) :

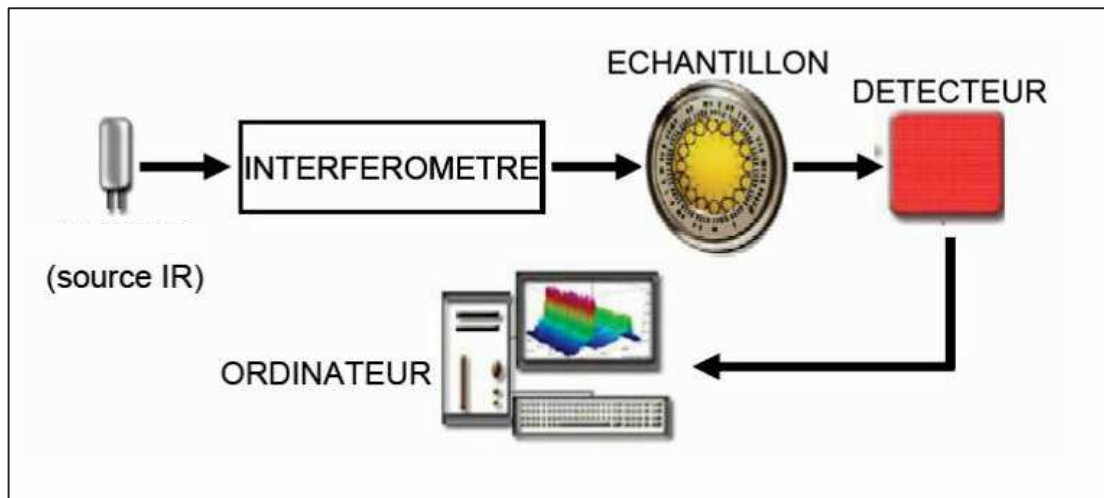


Figure III-6 : figure représentative d'un spectromètre FTIR

Le faisceau infrarouge provenant de la source se dirige vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs de l'interféromètre vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite vers le détecteur pour être transformé en signal.

II. Type d'information

Les analyses ont été effectuées in situ lors des activations thermiques. Ceci nous a permis de suivre l'évolution structurale des molécules lors du chauffage et d'étudier la réactivité thermique des composés présents sur la surface minérale.

III. Appareillage et conditions opératoires

Les spectres ont été enregistrés en mode transmittance lors de l'analyse des pastilles autosupportées. Le spectromètre utilisé est de type Bruker-Vector 22. Il est équipé d'un détecteur de sulfate de triglycine deutérié (DTGS) ayant une résolution de 4 cm^{-1} pour 124 scans. Le montage utilisé a été conçu au LRS. Il permet l'analyse in-situ de la pastille soumise à une activation thermique sous vide. La figure III-7 montre un schéma représentatif et une photo de ce montage.

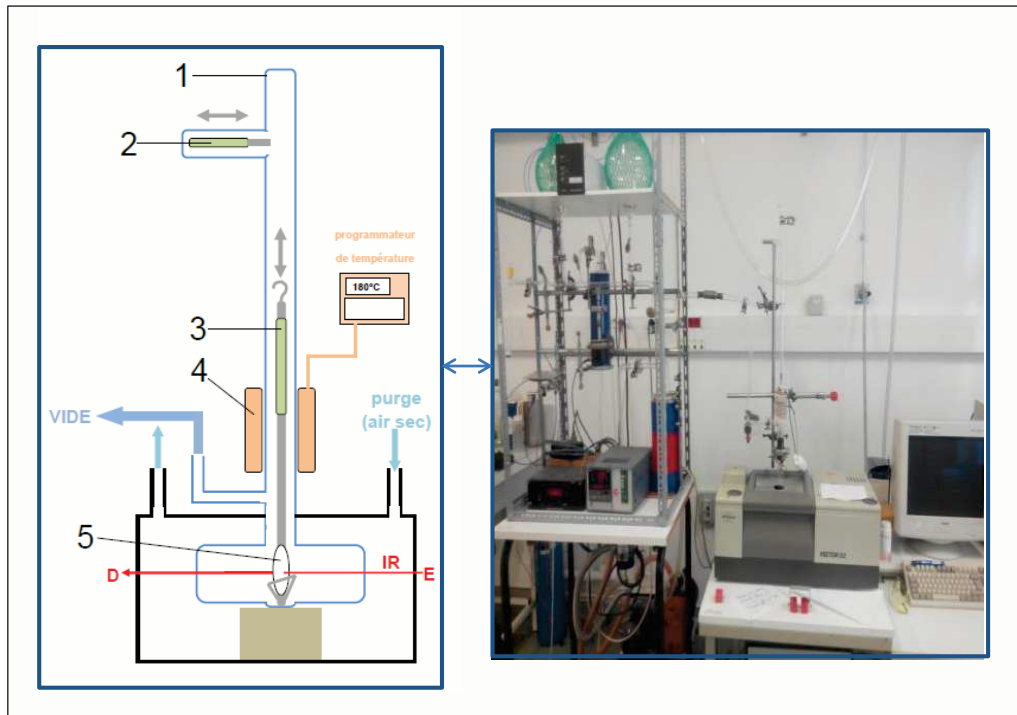


Figure III-7 : Le spectromètre FTIR utilisé (droite) et un schéma représentatif du montage expérimental (gauche)

Le système est d'abord soumis à un vide secondaire. Ensuite l'échantillon se déplace entre deux positions dans la cellule : le four (4) qui permet leur activation thermique in-situ et la position 5 qui permet l'enregistrement des spectres à T_a après chauffage et sans réexposition à l'air.

IV. Inconvénients

Cette analyse est manuelle et très sensible, on risque de casser la pastille lors de son déplacement entre les deux positions 4 et 5 ce qui nous oblige à répéter l'analyse. En plus les analyses ont été effectués sous vide ce qui n'est pas représentatif d'une atmosphère primitive.

Chapitre III

Réactivité thermique du D-Ribose sur la silice

IV. Chapitre III : Réactivité thermique du D-ribose sur la silice

A. Introduction

Comme mentionné dans le chapitre I, le ribose est l'un des constituants des nucléotides, il existe dans l'ADN ou l'ARN exclusivement sous forme de β -D-furanose, qui est une forme anomérique minoritaire en solution. D'après les analyses RMN ^{13}C de la littérature ainsi que les nôtres, le β -D-ribofuranose n'existe pas à l'état solide et représente en solution seulement 12 % du ribose total, en comparaison au β -D-ribopyranose dont la proportion est d'environ 60 %. Rappelons que quelle que soit sa forme anomérique, le ribose est instable en solution. En plus, le ribose pur se caramélise à partir de 90°C. Ces instabilités constituent deux problèmes majeurs qui pourraient rendre peu pertinent un scénario de formation des nucléotides (AMP) à partir de leurs constituants (ribose, adénine, phosphates). Il était donc utile d'étudier d'abord la stabilité du ribose déposé sur la surface de la silice.

On sait que la surface de la silice possède un caractère acide et celui-ci pourrait favoriser certaines réactions secondaires durant l'étape de séchage, telles que la caramélisation, la formation de la lactone ou de furfural. Ces réactions ne sont pas désirables dans notre système et elles provoquent la perte d'une partie de ribose pouvant interagir ultérieurement avec l'adénine et le phosphate inorganique.

Il est donc important et indispensable dans un premier temps de déterminer la réactivité thermique du ribose et les conditions qui permettent sa stabilisation sur la surface de la silice. Cette étape permet de déterminer la température maximale à laquelle on peut envisager une chimie de surface (phosphorylation, glycosylation) c'est-à-dire la température permise pour une activation thermique qui ne provoque pas la dégradation du sucre.

Dans ce cadre on a commencé notre travail par l'étude des réactivités chimique et thermique (entre T_a et 250°C) du D-ribose adsorbé par IHN sur la surface de la silice en présence et en absence des sels inorganiques (MgCl_2 , CaCl_2 , SrCl_2 , ZnCl_2 , CuCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3). Ces derniers ont été utilisés afin de mimer les conditions de la terre primitive. Les échantillons ont été analysés in situ par FTIR, ^{13}C RMN, DRX, ATG-TD.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'un article publié dans « Chemistry- A European Journal ». Dans cet article on présente d'abord la réactivité thermique du ribose massique. Ensuite, on aborde les résultats obtenus après adsorption de 3 densités massique différentes de ribose (5, 10 et 15%) en absence (deuxième partie) et en présence (dernière partie) des sels inorganiques.

B. Article

Thermal Behavior of D-Ribose adsorbed on silica: effect of inorganic salt coadsorption and significance for prebiotic chemistry

Mariame Akouche^a, Maguy Jaber^b, Emilie-Laure Zins^c, Marie-Christine Maurel^d, Jean-Francois Lambert^{a}, Thomas Georgelin^{a*}*

AUTHOR ADDRESS

^aSorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 and CNRS UMR 7197, LRS case courrier 178,
UPMC 4 Pl. Jussieu, 75252 PARIS CEDEX 05

^bSorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 and CNRS UMR 8220, LAMS, case courrier 225,
UPMC 4 Pl. Jussieu, 75252 PARIS CEDEX 05

^c Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 and CNRS UMR 8233, MONARIS, case courrier,
UPMC 4 Pl. Jussieu, 75252 PARIS CEDEX 05

^dUMR 7205- ISyEB, CNRS-MNHN-UPMC Univ Paris 06, F - 75005, Paris, France

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

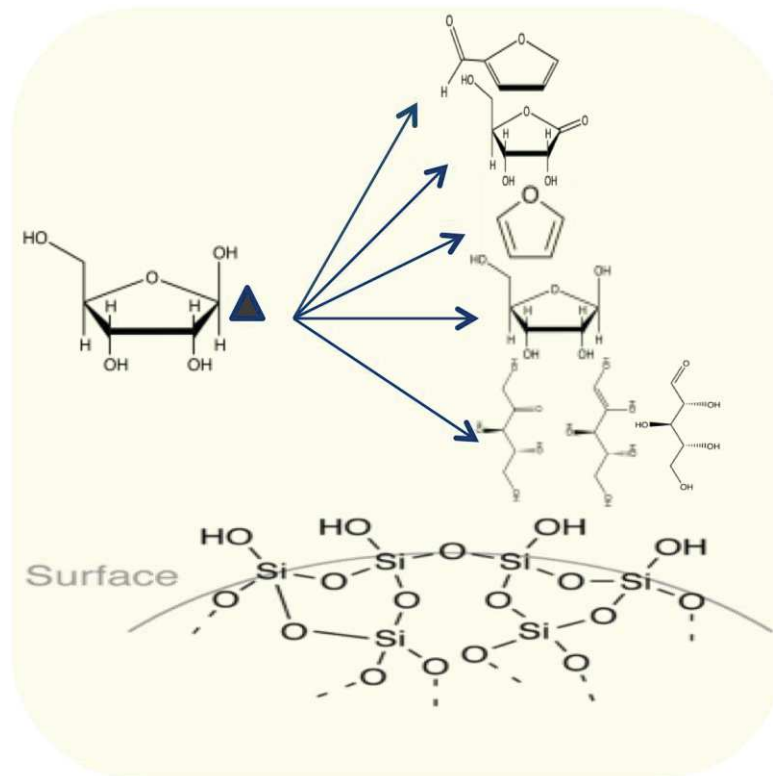
*Email: thomas.georgelin@upmc.fr

*Email: jean-francois.lambert@upmc.fr

ABSTRACT

Understanding D-ribose reactivity is a crucial step in the "RNA world" scenario because this molecule is a component of all extant nucleotides which compose RNA. In solution, ribose is quite unstable and in particular it is susceptible to thermal destruction. We have examined how ribose behaves upon thermal activation when adsorbed on silica, especially with the coadsorption of inorganic salts (MgCl_2 , CaCl_2 , SrCl_2 , CuCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 , ZnCl_2). A combination of ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR), in situ transmission InfraRed spectroscopy (IR), and ThermoGravimetric Analysis (TGA) revealed a variety of phenomena. When adsorbed alone on the surface, ribose remains stable up to 150°C , where ring opening is observed, together with a minor amount of oxidation to ribonolactone. All the metal salts we studied showed evidence of specific interactions with ribose after dehydration, most probably involving the formation of polydentate metal ion complexes. Anomeric equilibria were affected to various extents, generally favoring ribofuranoses. Zn^{2+} stabilized ribose up to higher temperatures than bare silica (180 to 200°C). Most other cations had an adverse effect on ribose selectivity, with ring opening already upon drying at 70°C . In addition alkaline earth cations catalyzed the dehydration of ribose to furfural and, to variable degrees, its further decarbonylation to furan. Transition metal ions with open d-shells took part in redox reactions with ribose, either as reagents or as catalysts. These results are significant to evaluate the likelihood of prebiotic chemistry scenarios, but they might also be of interest for the valorization of biomass-derived carbohydrates by heterogeneous catalysis.

TOC GRAPHICS

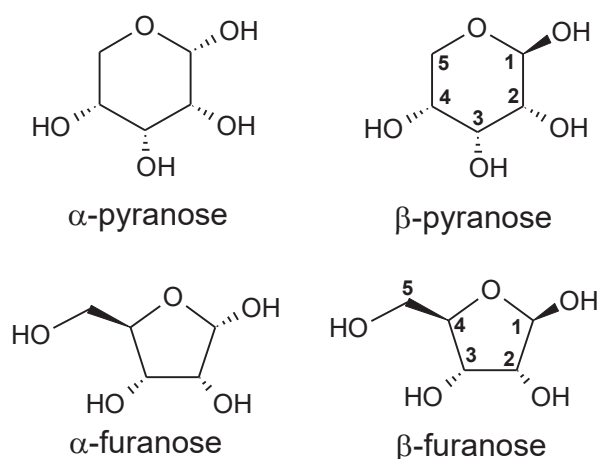


KEYWORDS Prebiotic chemistry, RNA world, D-ribose, Silica, Mineral surfaces

Introduction

In the prebiotic scenario of the "RNA world",¹ RNA oligomers are considered as the first biological molecules to have emerged. This idea is based on the fact that some RNAs are the only biopolymers to possess at the same time information capability, together with catalytic properties, currently observed in several ribozymic motifs and species such as viroids. Combining both abilities in the same molecule allows eschewing the "chicken-and-egg" dilemma that would be implied if the choice were between DNA and proteins.

RNA is a polymer of nucleotides, themselves composed of phosphates, nucleobases and a specific pentose carbohydrate, namely D-ribose. Therefore studies of ribose synthesis, of its conditions of stability, and of its further reactions such as phosphorylation and glycosylation are particularly interesting to explain the formation of RNA.



Scheme 1: Ribose polymorphs

Ribose can be synthesized in abiotic conditions together with other carbohydrates from the formose reaction,² based on the polymerization of formaldehyde. There are several problems with this scenario, however. First, ribose is often a rather minor product of the formose reaction.³ Second, assuming it can be synthesized, the ribose molecule is quite

unstable in aqueous solution.⁴ For example, at pH 9 and 60°C, its half-life is about 50 h; closer to physiological conditions, at pH 7 and 37°C, it should be around 500 h if one extrapolates from the data of Miller and co-workers.⁴ Then, as in many prebiotic scenarios, there is a selectivity problem. Not only does life use only D-ribose, excluding L-ribose, but among the four anomeric forms of this molecule (cf. Scheme 1), nucleotides and RNA exclusively use the β -D-ribofuranose form. In aqueous solutions, in contrast, this form is not predominant, typically accounting for 12% of all ribose in solution.⁵

Recent studies have attempted to solve the stability and the selectivity problems by invoking the formation of borate or silicate complexes in solution.^{2, 6-9} These complexes result from the formation of two covalent bonds between the oxygens of two -OH groups of the ribose molecule and the boron (resp. silicon) atom. It has been observed that such a complexation stabilizes ribose, and what is more, preferably its furanose forms. Theoretical results have shown that indeed silicate/ribose complexes should be formed exclusively with the furanose form, because its HO-C-C-OH dihedral angle is sufficiently small to allow the formation of a planar five-membered ring.⁸

The silicate or borate scenarios have shown the interest of considering inorganic / organic interactions to study the origins of life. They deal with interactions in solution; another direction of research is the interaction of small biological molecules with surfaces of inorganic materials, i.e., interfacial chemistry. It was first proposed in 1951¹⁰ that mineral surfaces could have played a role in the emergence of life. Later, experimental studies showed that e.g. silica and clay surfaces can indeed induce prebiotically interesting reactions such as the formation of peptide bonds between amino acids,¹¹ which is related to the capacity for protein adsorption,^{12,13} or the oligomerization of nucleotides.¹⁴ Our team

has demonstrated the ability of silica and other surfaces to promote the oligomerization of amino acids to peptides or of monophosphate to polyphosphates.¹⁵⁻²⁴ We have also recently reported that the silica surface stabilizes D-ribose upon drying, and cause a small but significant selection of the furanose form.²⁵

The present work intends to expand these initial results by focusing on the thermal reactivity of ribose adsorbed on amorphous silica (SiO₂). Silica represents a realistic model of mineral phases existing on the primitive earth such as cherts; it is also a desirable support from the point of view of the ease of characterization by such techniques as IR, NMR and TG.²² Our goal is to study ribose reactions of prebiotic interest such as glycosylation or phosphorylation on the surface of silica. The study of the thermal reactivity of ribose is a prerequisite for such studies since the reagents should not be destroyed in the conditions tested.

To the best of our knowledge, there is no information about the thermal reactivity of pentoses adsorbed on mineral surfaces. There exist some studies of the thermal reactivity of bulk carbohydrates²⁶⁻³² but even in this case many questions remain unanswered as these studies are often concerned only with applications to the analysis of carbohydrate mixtures. Studies of sugars in acidic solutions or brines are relevant too as they illustrate some of the possible reactions of carbohydrates, from ring opening to the formation of furfural by dehydration when the activity of water is low enough. Lactones (cyclic esters) can also be formed but they require an oxidative step: the sugar ring is opened and isomerized to the enediol form, and the latter is oxidized to a linear carboxylic acid which produces the lactone by internal condensation with recyclization.

The present study proposes to evaluate the stability of ribose under thermal activation and to analyze the chemical behavior of ribose on silica surfaces, both alone and in the presence of inorganic salts. In a prebiotic setting, the deposition of ribose from an aquifer, presumably upon drying, could have been accompanied by the co-deposition of minerals from sea water. We chose not to attempt to reproduce a realistic composition of primordial seawater, but to focus on simple systems consisting of ribose and the chloride salt of a cation in the following list: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} . Mg^{2+} is well-known for its role in the coordination chemistry of nucleotides. Compared with the other alkaline earth cations, Ca^{2+} and Sr^{2+} , it can provide information on the role of Lewis acidity, which decreases when going down the alkaline earth column in the periodic table. Furthermore, Mg^{2+} and Ca^{2+} easily leach from meteoritic minerals.³³ The other four elements are transition metals that could have leached from the prebiotically important sulfide minerals.^{34,35} Fe^{2+} , Fe^{3+} , and Cu^{2+} have open (nd) subshells allowing them to take part in redox reactions.

Materials and methods

Adsorption procedures

Ribose adsorption was carried out by impregnation methods. In this procedure, 300 mg of amorphous silica ($380 \text{ m}^2/\text{g}$) were wetted with 4 mL of a ribose solution. The ribose concentrations were chosen so as to provide 5.0, 10.0 and 15.0 weight % ribose loading with respect to the silica support. The pastes obtained after wetting of the silica were stirred at room temperature for 3 h and then dried overnight at 70°C in an oven under room

humidity. Samples obtained after drying will be denoted as 5% ribose/SiO₂, etc. "ribose/SiO₂", with the percentage value omitted, will refer to the "basis" sample, i.e. to the 10% loading.

Experiments were also carried out where ribose was coadsorbed with divalent metal salts. 10.0 weight% of ribose per silica weight were coadsorbed with metal chloride, using ribose/metal molar ratios of either 1:1 or 2:1. The samples were equilibrated and dried in the same way as for the ribose/SiO₂ series. Dried samples will be called ribose-metal (x:1)/SiO₂; when the molar ratio is omitted, it is understood to be equal to (1:1).

Analytical techniques

- TGA of the samples was carried out on a TA Instruments Waters LLC, with a SDT Q600 analyzer, using a heating rate $\beta = 5$ °C/min under dry air flow (100 mL/min). For silica-supported samples, masses were normalized to the residual mass at 800°C, which corresponds to anhydrous silica without organic matter. All the weight losses assigned to transformations of supported organic molecules were quantified between limits determined from the DTG traces, and corrected for the weight loss of the bare support in the same temperature range.

- Infrared (IR) spectra of solid samples were recorded in the transmission mode on self-supported pellets in a cell fitted with KBr windows. Samples may have two positions in the cell; one position is in the oven, allowing in situ thermal treatments under vacuum or various atmospheres, and the other position allows room-temperature recording of spectra without re-exposure to air. Fourier Transform (FT) IR spectra were recorded on a Bruker-

Vector 22 FT-IR spectrometer equipped with a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector, having a nominal resolution of 4 cm^{-1} , by adding 128 scans.

- Attenuated total reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FT-IR) was used complementarily to investigate the effect of the temperature on bulk ribose. For these experiments, the samples were heated inside a heat chamber at ambient pressure. For each sample, 40 scans were added and the spectra were registered in the $400 - 4\,000\text{ cm}^{-1}$ spectral region with a nominal resolution of 1 cm^{-1} . The ATR-FT-IR approach provides spectral information while minimizing sample preparation.

Solid-State NMR: ^{13}C cross-polarization magic angle spinning (CP-MAS) spectra were recorded at room temperature with a Bruker Avance 500 spectrometer with a field of 11.7 T equipped with a 4 mm MAS probe with a spinning rate of 10 kHz. The pulse angle was 30° , decoupling was applied at 50 KHz, and the recycle time was 10 s for bulk ribose and 1 s for adsorbed ribose. The contact time was 1000 μs (other values were tested as well in one instance, see below).

Liquid-state NMR: ^{13}C spectra were recorded on a Bruker Avance III 500 spectrometer, using a 1D sequence with power-gated decoupling, a 30° flip angle and a recycle time of 2 s.

Results and discussion

1. Thermal reactivity of bulk ribose

TGA

Figure 1 shows the DTG signals of the various samples heated under dry air flow. Bulk D-ribose shows an endothermic event without weight change at $90\text{ }^\circ\text{C}$, due to ribose melting,²⁶

followed by four weight loss events at 195 °C (endothermic, -20 % of starting mass), 280 °C and 320 °C (both exothermic, -51 %) and 510 °C (strongly exothermic, -29 %) finally resulting in quantitative combustion (Figure 1). No significant weight loss is observed before 195°C, but already after melting liquid ribose shows signs of transformation such as browning and a typical lactone odor. In addition, as the following paragraph shows, tautomerization reactions are suggested by IR, which cannot be detected by TG since they do not cause any weight loss. This behavior is compatible with the rather limited information available in the literature on the TG of pentoses.³⁶⁻³⁸ The endothermic event at 195 °C could be due to a dehydration step (the corresponding weight loss amounts to between one and two water molecules per ribose unit). It has been claimed to be indicative of carbohydrate polymerization by condensation, but the matter has not been investigated in detail. The material collected after this step is black and vitreous. Full polymerization to infinite chains would result in the elimination of only one water molecule per ribose, so the larger values measured indicate that modifications of the ribose skeleton also occur in the 195°C event.

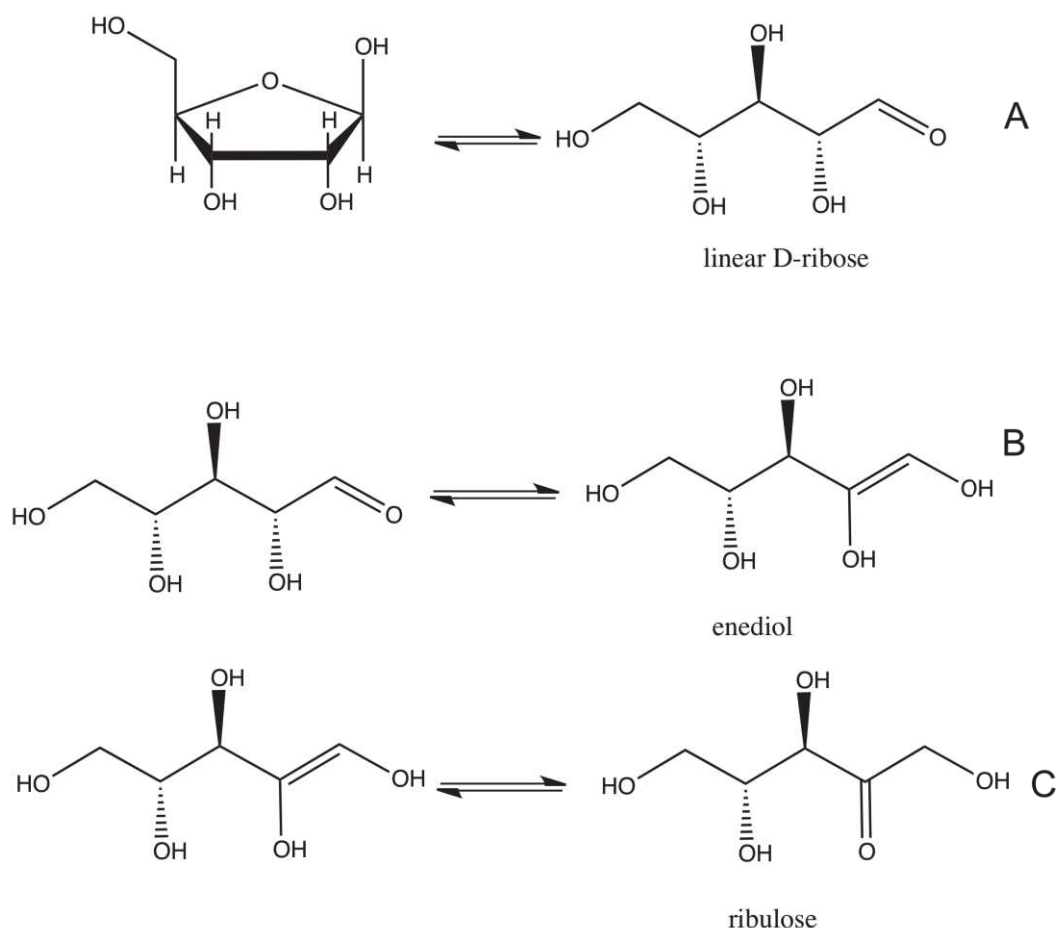
FTIR spectroscopy :

The IR spectra of bulk D-Ribose were recorded at increasing temperatures, below and above the melting point (Figure 2A: rapid heating, and 2B: slow heating). At room temperature, the spectrum presents vibrational bands characteristic of cyclic ribose. Table SI-1 shows that our data are in good agreement with those previously published by Mathlouthi and Seuvre.³⁹ Some of the proposed assignments are open to question; in particular, these authors have claimed to observe vibrations attributable to both the pyranose form (1116 cm⁻¹, 890 cm⁻¹) and the furanose form (1160 cm⁻¹, 910 cm⁻¹), which seems at odds with solid-state NMR results (see below). In fact we carried out numerical calculations suggesting that it is

extremely difficult to discriminate the different anomers based on their vibrational frequencies. These data will be the object of a later publication. For the time being, we may underline that the most intense vibrations of D-ribose fall between 1200 and 900 cm^{-1} , which will later preclude their observation in ribose/ SiO_2 samples because of overlap with the lattice vibrations of the SiO_2 support. At room temperature, no carbonyl signal was present, meaning there was no linear ribose (or products of further degradation, cf. infra).

Two series of spectroscopic experiments were carried out to investigate the thermal processes occurring in this crystalline sample. In the first series of experiments, 0.1 mg of D-ribose were subjected to a rapid heating, thanks to a heatgun. In the second series of experiments, 5.0 mg of D-Ribose were progressively heated inside a heating chamber.

For quick heating, as long as one remained below the melting point, no structural evolution was observed. More specifically, no vibrational bands were observed in the carbonyl region. Above the melting point (90 °C), two vibrational bands appeared at 1722 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{O}$) and 1630 cm^{-1} (δOH ; Figure 2 A). They are respectively diagnostic of linear D-ribose and the enediol species.⁴⁰ This means that in bulk liquid ribose, thermal activation has caused the opening of the ribose ring and that a keto-enol isomerization has taken place (scheme 2), similar to the reactivity of ribose in solution.



Scheme 2: Thermally-induced ring opening (A) and enolization (B) equilibria of D-Ribose (with the β -furanose polymorph chosen as the starting point). Transformation of the enolic form into D-ribulose (C) is also illustrated.

Furthermore, the shapes of the bands between 1500 cm^{-1} and 500 cm^{-1} are strongly affected by heating: below $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, well-resolved bands are observed while above the melting point, they are significantly broadened and an envelope is observed. This suggests a degree of chemical heterogeneity in the liquid.

In the second series of experiments where a more gentle heating was applied to 5.0 mg of D-ribose (Figure 2B), a similar trend is observed, but the linear D-Ribose and the enediol species only appear at higher temperatures (around 150°C instead of 90°C). Furthermore, the amounts of these two species appear to be more limited. We believe that polymerization is in competition with the ring opening process, and is more favored under gentle heating, i.e. in the second heating procedure for IR, but also in the TGA experiments.

2. Thermal reactivity of adsorbed ribose

X-Ray Diffraction (XRD) and TGA

We estimate that a physical monolayer of ribose molecules on a surface would correspond to 1.6 molecules / nm². This figure can be compared to the surface densities of ribose in our samples, namely 0.5, 1.1 and 1.5 molecules per nm² for 5%, 10% and 15 % ribose/SiO₂ respectively, suggesting submonolayer coverage (but close to the monolayer for 15 % ribose/SiO₂). Indeed no trace of bulk ribose was detected by XRD in any of these samples.

The TG of the silica support (Figure 1) shows that it undergoes a strongly endothermic loss of physisorbed water up to 100°C, followed by a continuous, low-intensity weight loss between 100 and 600°C, without clearly defined maxima, that can be assigned to the condensation of surface silanols.⁴¹

Figure 1 also shows the differential thermograms (DTG) of 5.0, 10.0 and 15.0 % ribose/SiO₂. As on the raw silica support, desorption of physisorbed water is observed between 20 and 110°C. Two broad events at 170 and 308°C are present only in the ribose-containing samples; as shownn in Table 1, the total weight loss for these two events (corrected for the contribution of the support) is close to the nominal ribose loading, and therefore most of the supported ribose has been eliminated by 450°C.

The event at 170°C is endothermic. The associated weight loss amounts to one to two molecules of water per ribose unit - in fact, close to 2 molecules for 5% and 10% ribose/SiO₂. The event at 308°C is exothermic, probably corresponding to combustion of the remaining organic matter.

Table 1: Weight losses (in weight % of the silica support) corresponding to the two DTG peaks attributable to supported ribose.

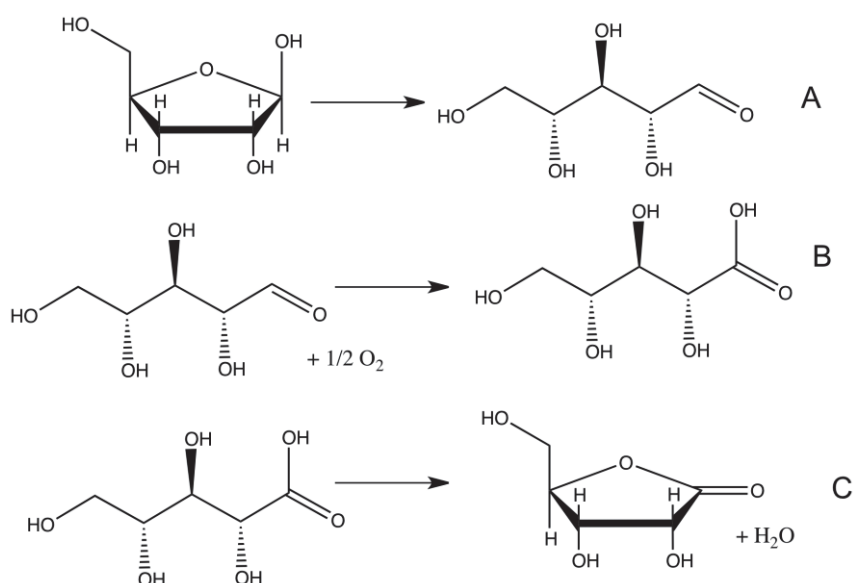
Sample	Weight loss, 1st peak	Weight loss, 2nd peak	Weight loss, total
5% Ribose/SiO ₂	1.1	3.8	4.9
10% Ribose/SiO ₂	2.5	7.3	9.8
15% Ribose/SiO ₂	2.6	10.5	13.1

FTIR analyses were carried out on supported ribose samples. The spectra contain less usable information than those of bulk ribose because of the predominance of vibrational bands of silica. Only the region between 1900 and 1350 cm⁻¹ can be observed without interference from the silica bands. Our previous work²⁵ showed that ribose is adsorbed on silica under its cyclic form and no trace of degraded products is observable at room temperature, as confirmed by ¹³C NMR results. All the IR bands recorded at room temperature may be assigned to cyclic ribose and silica nanoparticles.

The IR spectrum of 10% ribose/SiO₂ is shown in Figure 3 (it may be compared with the spectra of 5% and 15% ribose/SiO₂ given in Figure SI-1). At room temperature, the observable bands (mostly the δ_{HCH} at 1455 and 1410 cm⁻¹) could be ascribed to adsorbed cyclic ribose, with no indication of degradation. Activation at temperatures lower than 150°C did not result in any significant spectrum modification. From 150 to 180 °C, a vibrational band grew in the $\nu_{\text{C=O}}$ region, and as in the case of bulk ribose (cf. supra) it can probably be assigned to linear ribose; it seemed to shift as a function of temperature, as it

was first centered at 1723 cm^{-1} and moved to 1728 cm^{-1} after activation at the final temperature of 250°C . The shift of this band with respect to bulk ribose could be due to the isomerization to linear ribulose which has been reported in the literature for ribose submitted to thermal activation in solution.⁴⁰ The intermediate in the formation of this compound is the enediol form of ribose (cf. scheme 2), which should have a characteristic vibration in the $1630\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ range. No new signal was clearly observed in this region, but a small contribution would probably not be distinguished from the residual δ_{HOH} band of H_2O , and therefore we cannot completely exclude the presence of this intermediate.

From 180 to 250°C , a second vibrational band appears at 1775 cm^{-1} which could be attributed to a cyclic ester, such as the one present in ribonolactone. The formation of ribonolactone from ribose is an oxidative process. According to the literature, a three-steps mechanism is involved as illustrated in scheme 3: **A**, formation of linear ribose (already illustrated in scheme 2) ; **B**, oxidation of the carbonyl group to ribonic acid; **C**, dehydration to ribonolactone.



Scheme 3: A 3-step mechanism leading to the formation of ribonolactone from D-ribose (see text).

To confirm the hypothesis that an oxidative process is taking place as postulated in Step B, thermal activation of ribose/SiO₂ was carried out in O₂ flow and the vibrational bands that we had assigned to linear ribose and to ribonolactone were quantified. The band of ribonolactone was five times more intense at 250°C under O₂ flow than under (nominal) vacuum. At the same time, the proportion of linear ribose was twice as high under O₂ flow as under vacuum: the opening of the ribose ring seems also to be facilitated under O₂. The occurrence of an oxidative reaction under nominal vacuum remains surprising since our systems are not supposed to contain oxidants. The most logical candidate would be residual O₂ in the vacuum ramp. Attempts to duplicate our results revealed that the intensity of the band assigned to ribonolactone was indeed strongly dependent on the experimental setting.

With respect to the effect of ribose loading, the amount of linear ribose formed at a given temperature increases faster than the initial amount of ribose (Figure SI-2). This could hint at a chemical heterogeneity of the ribose/surface interaction. As for the amount of ribonolactone, it does not show a clear trend as a function of ribose coverage.

3. Effect of the coadsorption of divalent cation salts on the reactivity of adsorbed ribose

XRD and TGA

In ribose-Sr/SiO₂, XRD revealed the presence of bulk SrCl₂. No bulk salt phases were observed for the other ribose-metal/SiO₂ samples. This probably means that metal cations (and chloride anions as well!) are well dispersed on the silica surface (see Figure SI-3 for X-Ray diffractograms of the various samples).

DTG traces of the various ribose-metal/SiO₂ samples are presented in Figure 4 and the weight losses corresponding to the different identifiable thermal events can be found in table 2.

Table 2: Weight losses (in weight % of the silica support) corresponding to DTG peaks in Ribose-metal/SiO₂ samples.

Sample	Peak Temperatures T _{max} (°C)	Weight losses (%)	Thermal effect (DTA)	Total weight loss, all ribose peaks (%)
Ribose/silice	38	2.0	endothermic	9.8
	170	2.5	endothermic	
	304	7.3	exothermic	
Ribose- Mg / SiO ₂	65	14.0	endothermic	12.3
	165	5.5	endothermic	
	about 370	6.8	(weak)	
Ribose- Ca /SiO ₂	57	6.4	endothermic	7.9
	172	3.4	endothermic	
	about 320	4.5	exothermic	
Ribose- Sr / SiO ₂	53	3.3	endothermic	9.6
	172	4.4	endothermic	
	about 315	5.2	(weak)	
Ribose- Fe ²⁺ / SiO ₂	42	3.9	endothermic	10.6
	200	10.6	exothermic	
Ribose- Fe ³⁺ / SiO ₂	39	3.0	endothermic	9.6
	199	9.6	exothermic	
Ribose- Cu / SiO ₂	43	1.8	endothermic	9.4
	144	2.6	?	
	257	6.8	(weak)	
Ribose- Zn / SiO ₂	47	4.1	endothermic	11.1
	183	5.0	endothermic	
	320	6.1	exothermic	

Most of the ribose-metal/SiO₂ samples, except ribose-Fe^{x+}/SiO₂, have similar TGA profiles with three peaks in the DTG. The first one under 100°C is endothermic, the second one between 150 and 200°C is generally also endothermic (the direction of the effect is unclear in the case of Ribose-Cu/SiO₂) and the third one is exothermic when the thermal effect can be ascertained. Furthermore, the sum of the weight losses for the second and third peak is close to 10% for a majority of the samples (10 ±0.6%), i.e., close to the theoretical ribose loading, and it seems logical therefore to assign both of them to the elimination of ribose; note however that significantly higher values are measured for ribose-Zn/SiO₂ (11.1%) and ribose-Mg/SiO₂ (12.3%), and a significantly lower one for ribose-Cu/SiO₂ (7.9%).

The first peak below 100°C can be attributed to the loss of weakly held water, which may be adsorbed on the free surface, interacting with ribose or bound to the cations in their hydration sphere. It is also present in ribose-free metal salt/SiO₂ samples that were investigated separately (see Figure SI-4). In both Mg/SiO₂ and Cu/SiO₂, the shape of the peak shows a structure that probably indicates well-defined transitions between [M(H₂O)₆]²⁺ complexes of well-defined stoichiometry. Generally speaking, it is difficult to discriminate between metal-bound and surface-bound water. However, the alkaline earth/SiO₂ series shows a strong variation in the amount of weight loss that follows the trend in hydrophilicity, with ribose-Mg/SiO₂ (17%) > ribose-Ca/SiO₂ (7.2%) > ribose-Sr/SiO₂ (6.45%), while transition metal/SiO₂ samples contain lower amounts of water (5.0 to 5.5%).

Among the ribose-metal/SiO₂ samples, weight losses are also strongly variable. In ribose-alkaline earth/SiO₂ samples, they are very similar to the ribose-free samples, suggesting that hydration water mostly interacts with the metal cations and that this

interaction is not disturbed by the presence of ribose. On the other hand, in ribose-transition metal/SiO₂ samples, the presence of ribose does cause some changes in hydration, ribose-Cu/SiO₂ being the least hydrated.

The second, endothermic peak in DTG traces is reminiscent of the one that had been observed at 170°C in ribose/SiO₂, with a 2.5% weight loss. Note first that the metal salts themselves do not give rise to a TG event in this temperature range (Figure SI-4; CuCl₂/SiO₂ is an exception, with a small peak at 287°C that may be due to a redox between chloride ions and Cu²⁺). In the presence of alkaline earth metals, the second peak is also located at 170°C with a larger weight loss that depends on the nature of the metal cation: about 3.4%, 5.5% and 4.4% respectively in the presence of calcium, magnesium and strontium. Transition metals induce different changes. In the presence of copper, this peak shifts to a lower temperature (144°C) with a 2.5% weight loss. In contrast, in the presence of zinc, this peak shifts to a higher temperature (185°C) with a 4.1% weight loss. Some of the weight loss values seem too high to be assigned only to ribose dehydration reactions, since even extensive dehydration to furfural (see IR Results and discussion) would result in the loss of only three water molecules per ribose, i.e. a loss of 3.6% on the basis of a 10% ribose loading. Thus, some metal ions promote extensive ribose degradation at low temperatures.

The highest-temperature peak observed in the thermograms shows an exothermic event that can be attributed to the oxidation of residual organic matter. In comparison to ribose/SiO₂ (where T_{max} = 304°C), this peak is considerably broadened and shifted to higher temperatures in ribose-alkaline earth metals/SiO₂ systems (T_{max} between 315 and 370°C) and ribose-Zn/SiO₂ (T_{max} about 320°). In contrast, the combustion of organic matter occurs at lower temperatures for ribose-Cu/SiO₂ (T_{max} = 257°C) and even more so for ribose-

$\text{Fe}^{x+}/\text{SiO}_2$, where the combustion event cannot be separated from the second peak. In the latter two cases, the low-temperature combustion event suggests that the supported metal ion is intimately involved in the oxidation event.

FTIR spectroscopy

- **Room temperature spectra**

The metal ions we investigated show different effects on the IR spectrum, both at room temperature and upon thermal activation. The spectra of the different samples are presented in Figures 5 and 6.

Before thermal activation, differences with ribose/ SiO_2 are already apparent (compare lowest spectra in Figures 5 and 6 with Figure 3). The δ_{HOH} band of water around 1630 cm^{-1} is a good indicator of the hydration state of the material. It is more intense in all ribose-metal/ SiO_2 than in metal-free samples, and for the alkaline earth cations its intensity follows the order of hydrophilicity ($\text{Mg}^{2+} \gg \text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+}$), indicating that a lot of water is bound to the cations at room temperature. For the transition metal cations, the order of intensity is ($\text{Fe}^{x+} \gg \text{Cu}^{2+} = \text{Zn}^{2+}$); however, the maximum intensity for the ribose- Fe/SiO_2 samples is artificially inflated by the presence of another band in close vicinity.

As regards the δ_{HCH} vibrations, in ribose-transition metal/ SiO_2 , the band at 1452 cm^{-1} is unaffected by the presence of the cations, while the second one shows significant bathochromic (red) shifts. We evaluate them at -20, -18, and -13 cm^{-1} respectively in ribose- Zn/SiO_2 , ribose- $\text{Fe}^{x+}/\text{SiO}_2$ and ribose- Cu/SiO_2 , for a ribose/metal molar ratio of 1:1, but it is less important in the ribose-metal (2:1)/ SiO_2 series (about 8 cm^{-1}). It indicates a direct interaction between metals and sugar, probably involving the C_5 carbon. The effect of

alkaline earth cations on this band are more complex: it appears split into two components, one blue-shifted and the other one red-shifted, in ribose-Mg/SiO₂ and ribose-Sr/SiO₂, while only the blue-shifted component appears in ribose-Ca/SiO₂.

New bands are also apparent in the carbonyl stretching ($\nu_{C=O}$) region in ribose-Fe^{x+}/SiO₂ and ribose-Cu/SiO₂, for both molar ratios, but not in ribose-Zn/SiO₂. The first one, at 1714 cm⁻¹, appears for ribose-Cu/SiO₂ and ribose-Fe²⁺/SiO₂ (but not ribose-Fe³⁺/SiO₂). The similarity with the aldehyde band of furfural is probably coincidental since the other bands of this molecule are not present. We tentatively attribute the band at 1714 cm⁻¹ to a linear ribose, but since its wavenumber is significantly lower than in free linear ribose, we suggest that it corresponds to linear ribose complexed by iron (II).

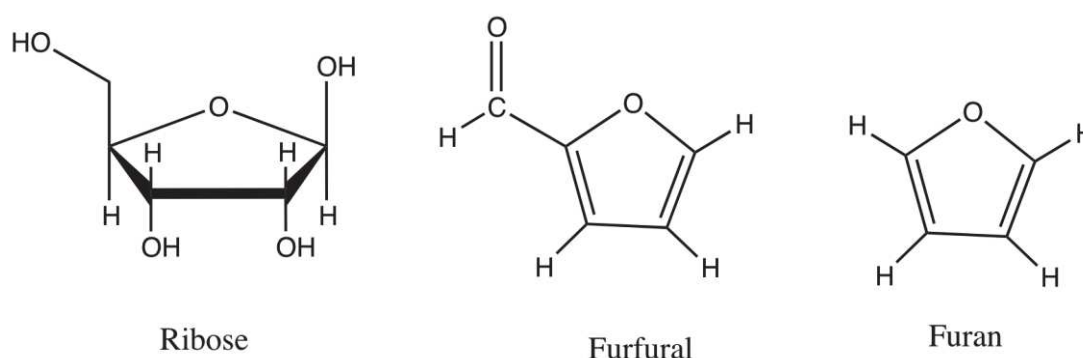
The shoulder at 1661-1662 cm⁻¹ in ribose-Fe^{x+}/SiO₂ and 1658 cm⁻¹ in ribose-Cu/SiO₂ is probably characteristic of the enediol. The position of this band would then be significantly blue-shifted with respect to the same species in bulk ribose, and this might be the effect of complexation to the metal ions. Enediols, like aromatic diols such as catechol or dopamine, are known to be good complexing agents,⁴² including for Fe^{x+} centers. The complexes of enediol with iron and copper ions could be stabilized by crystal field stabilization energy (CFSE) effects, causing a shift of the ribose isomerization equilibria towards this form.

With regard to the alkaline earth-containing samples, a small band is observed at 1702 cm⁻¹ for Ribose-Mg/SiO₂ and 1710-1715 cm⁻¹ for Ribose-Ca/SiO₂, but it is not present for Ribose-Sr/SiO₂. An assignment to complexed linear ribose may also be proposed here on the basis of parsimony, but the carbonyl shift would be more important in Ribose-Mg /SiO₂ than in the other samples, which is somewhat surprising.

Effect of thermal activation on spectra

We shall now consider the evolution of IR spectra upon thermal activation.

In ribose-Mg (1:1)/SiO₂, no changes are observed from room temperature to 100°C, except for a gradual decrease of the band at 1630 cm⁻¹ indicative of dehydration. At 150°C, a conspicuous new band appears at 1533 cm⁻¹ ($\nu_{C=C}$ region), a region where no signal was detected for ribose/SiO₂ irrespective of the temperature. At the same time, the absorption in the 1400-1500 cm⁻¹ region is also modified with the appearance of a new maximum at 1415 cm⁻¹, and the carbonyl band is red-shifted by -4 cm⁻¹; it seems to disappear above 180°C. These observations suggest that ribose has been strongly dehydrated, with the concomitant production of C=C double bonds. One logical outcome of this dehydration reaction would be furfural (cf. Scheme 4), but this product should have a very strong $\nu_{C=O}$ band at 1714 cm⁻¹ due to its aldehyde function, which is not observed here. The product that forms must therefore have C=C double bonds and no aldehyde function. This is the case for furan, C₄H₄O, and the subtraction spectrum is indeed rather compatible with that of furan.⁴³ The evolution of ribose-Mg (2:1)/SiO₂ is almost indiscernible from that of ribose-Mg (1:1) /SiO₂.



Scheme 4: Furfural and furan, as compared to D-Ribose

For ribose-Ca/SiO₂ and ribose-Sr/SiO₂, more complex changes are observed, with no less than six new bands appearing at 150°C and above (1764, 1714-1718, 1580, 1538, 1475

and 1411 cm^{-1}). They correspond to several different products since their relative intensities change with the temperature. One of them could be ribonolactone ($\nu_{\text{C=O}}$ at 1764 cm^{-1}), which remains a minor species. The two bands in the $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ range can be assigned, as above, to $\nu_{\text{C=C}}$ bands, possibly of different products. They appear at the same time as the $\nu_{\text{C=O}}$ at $1714\text{-}1718\text{ cm}^{-1}$ and together, these observations could indicate the formation of furfural. In comparison to ribose-Mg/SiO₂, we propose that in ribose-Ca/SiO₂ and ribose-Sr/SiO₂ both furfural (completely dehydrated product) and furan (dehydrated and decarboxylated) are formed.

Heating of Ribose-Zn/SiO₂ up to 150°C does not cause any changes in the spectrum. The first modifications are only apparent at 180° and become conspicuous at 200°C . They are very similar to what was observed at lower temperatures in ribose-Mg/SiO₂ and ribose probably undergoes the same transformations here, only at a significantly higher temperature. Thus, the presence of Zn²⁺ in a 1:1 ratio causes a thermal stabilization of ribose as compared to ribose/SiO₂, and, actually, also to the other ribose-metal/SiO₂. In contrast, the bands that we have previously assigned to linear ribose (1730 cm^{-1}) and ribonolactone (1780 cm^{-1}) are observed in ribose-Zn (2:1)/SiO₂ already at 150°C . We hypothesize that Zn²⁺ is able to form a complex with cyclic ribose that results in the stabilization of the latter molecule with respect to ring opening. If the stoichiometry of this complex is 1:1, then all ribose molecules may be complexed, and thus stabilized, in ribose-Zn (1:1)/SiO₂, while half of them would remain uncomplexed in ribose-Zn (2:1)/SiO₂, and therefore follow the same transformation as without zinc.

Copper and iron induce very different thermal reactivities as compared to zinc and alkaline earths. Below 150°C, linear ribose (1720 cm⁻¹) and enediol (1658 cm⁻¹) are present, the latter in large quantities, in ribose-Cu/SiO₂ and ribose-Fe^{x+}/SiO₂.

In ribose-Cu/SiO₂, at 150°C, a very strong band grows in the $\nu_{C=O}$ region at 1731 cm⁻¹ and the enediol band disappears. No bands are apparent in the $\nu_{C=C}$ region (this is in exact opposition to ribose-Mg/SiO₂). Several assignments could be proposed for this $\nu_{C=O}$ band. It might be due to one or several aldehydes, including glycolaldehyde,⁴⁴ formed by catalytic retro-aldol fragmentation of ribose.⁴⁵ Or it might be due to a carboxylic acid formed through the oxidation of ribose by Cu²⁺, acting then as a stoichiometric reagent. Since the amount of the corresponding product, as indicated by the relative band intensity, is about twice lower in ribose-Cu (2:1)/SiO₂ than in ribose-Cu (1:1)/SiO₂, we would favor the second interpretation, but clearly more work ought to be done to clarify this point. Local browning of the sample was observed, possibly due to the products of copper reduction.

In ribose-Fe/SiO₂ samples the reactivity seems different again. The complexed enediol form is preserved at high temperatures, while a new, sharp band appears at 1558 cm⁻¹ and shoulders at 1510 and 1490 cm⁻¹ at higher temperatures. Thus, here, dehydration reactions must be considered again. We will not endeavor to precisely identify the reaction product(s) formed in these samples because their nature is not central to the main question motivating the present study, namely, the stability of ribose.

NMR spectroscopy:

The ^{13}C NMR spectrum of ribose in water solution has been reported previously and can be used as a basis for peak assignments in other samples. The spectrum we obtained (Figure SI-5) is identical to the one published by Ortiz et al.⁴⁶ In general four signals can be observed for each carbon, corresponding to the four anomers (although there is some overlap); the α_p and β_p forms are more difficult to discriminate than the others. The C1 peaks are particularly well resolved and can be used to quantify the anomeric ratios; it can also be checked that very similar ratios are obtained on the basis of the C4 peaks.

We have also recorded liquid-state ^{13}C NMR of solutions containing ribose and metal chlorides (1:1 ratio) in order to assess the complexing power of these salts (Figure SI-6, and Table SI-2). The addition of MgCl_2 , CaCl_2 , or ZnCl_2 did not have much effect on the chemical shifts of the various peaks, with displacements in general smaller than 0.1 ppm (except for the C5 peaks where +0.2 and +0.35 ppm shifts were observed in two cases). The intensity ratios were not significantly altered either. In contrast, the addition of SrCl_2 caused shifts up to 1.0 ppm, making the assignments of some peaks difficult, and the contribution of the α_f anomeric form was significantly exalted. In summary, the modifications of the ^{13}C NMR are very minor and do not indicate a coordination of ribose to Mg^{2+} , Ca^{2+} , or Zn^{2+} in aqueous solution (nor any strong binding of ribose to Cl^-), at most the formation of weakly H-bonded adducts. Sr^{2+} is a possible exception. These conclusions are significantly different from those of Ortiz et al.⁴⁶ who observed more important peak shifts (a few tenths to 2.0 ppm) for ribose in aqueous solution when KCl and NaCl were added to the medium; it should be noted however that these authors used much higher salt concentrations.

The ^{13}C CP-MAS NMR spectra of ribose/ SiO_2 , ribose-Mg/ SiO_2 , ribose-Ca/ SiO_2 , and ribose-Zn/ SiO_2 are presented in Figure 7 and compared with that of bulk ribose.

Ribose interaction with the silica surface in the absence of cations has been discussed in a previous paper.²⁵ In solution, the pyranose forms are predominant (82% of the total, for 18% of furanose forms). After adsorption on the silica surface, NMR peaks are much broader, typical of solid-state NMR, where the molecules have a low mobility. NMR peak positions remain compatible with the chemical shifts of ribose carbons. Thus, only ribose is present on the silica surface, in its four anomeric forms; yet adsorption somewhat modifies the anomeric equilibria, as the furanose forms increase to about 25 %, specifically due to promotion of the α_f form.

Likewise, for the ribose-metal/SiO₂ samples, all individually resolved peaks may be assigned to ribose carbons, and the remaining part of the spectrum is compatible with the envelope of overlapping ribose peaks. Table SI1 summarizes the chemical shifts of the various samples, at least those that could be determined precisely. Important shifts are observed in some cases with respect to ribose in solution, especially for ribose-Mg/SiO₂ where the peaks corresponding to C₁ are shifted between -3.6 and +7.2 ppm, while those of C₄ and C₅ are affected to a lesser extent; all the enantiomers are concerned. In ribose-Ca/SiO₂, in contrast, the peaks of C₄ and C₅ undergo more important shifts than those of C₁.

In ribose-Zn/SiO₂, among the signals that can be clearly discriminated, the C₁ peaks of the two furanose isomers are strongly affected, their C₂ and C₄ peaks much less so. The C₁ peaks of the pyranose forms are also shifted, but the effect is three times smaller than for the furanoses, leading us to believe that the latter are more strongly complexed.

Quantification of the anomeric forms was carried out on the basis of the C₁ peaks, which are the best resolved; the results are reported in Table 3. In some samples the C₄ peaks were sufficiently well-resolved to provide an independent estimate of the

enantiomeric ratios, and these estimates were not significantly different from the C₁-based ratios.

Table 3: Anomeric ratios calculated on the basis of the intensity of the C1 peaks.

Sample	% α_p	% β_p	Total pyranose	% α_f	% β_f	Total furanose
Ribose solution	20	62	82	6	12	18
Solid Ribose	n.d.	n.d.	100	-	-	0
Ribose/SiO ₂	29	47	76	15	9	24
Ribose-Mg/SiO ₂	18	48	66	18	16	34
Ribose-Ca/SiO ₂	23	26	49	29	22	51
Ribose-Zn/SiO ₂	27	9	36	14	50	64

Coadsorption with metallic salts promotes the ribofuranose forms over the ribopyranoses, as did the adsorption on bare silica, but to a larger extent. The proportion of ribofuranoses increases from 24% in ribose/SiO₂ to 34, 51 and 64% respectively in ribose-Mg/SiO₂, ribose-Ca/SiO₂ and ribose-Zn/SiO₂. The β/α ratios are also affected. In ribose-Mg/SiO₂ and ribose-Ca/SiO₂, both anomeric forms of ribofuranose increase, but the α_f to a larger extent than the β_f , leading to a β/α ratio of 0.8 and 0.7, respectively, as compared to 1.6 in ribose/SiO₂. In contrast, the opposite trend is observed in ribose-Zn/SiO₂: the β/α ratio actually increases to 3.6.

General discussion

Some articles concerning amino acids have drawn attention to the prebiotic potential of bulk organic molecules,^{47, 48} and therefore the study of bulk ribose is relevant. Our initial study of the reactivity of bulk ribose can be used as a benchmark against which to

evaluate the stability of ribose molecules in other environments. Melting at 90°C already induces chemical heterogeneity as indicated by the IR study - and by simple visual inspection. The inception of some chemical transformations depends on the heating procedure. One particular transformation that is easy to demonstrate spectroscopically is ring opening to linear ribose, followed by isomerization to enediol. Flash heating induces ring opening already at 90°C, and even upon gentle heating these reactions clearly appear at 150°C. It can be said with confidence that bulk ribose is no longer stable at 150°C.

When ribose is deposited on SiO₂, it remains in the form of a cyclic monomer. In particular, there are no observations that might indicate polymerization, probably due to the restriction in molecular mobility upon adsorption that prevents the monomers from encountering each other. The only effect of adsorption on ribose speciation is modification of the anomeric equilibria, as discussed below. At 150°C and above, ribose undergoes ring opening; between 180 and 200°C, oxidation must occur since a minor amount of ribonolactone is formed. The most likely oxidant is adventitious dioxygen remaining in the vacuum ramp (and if it is the case, the corresponding reaction would not be of prebiotic significance since the primordial atmosphere of the Earth was anoxic). Another possibility would be adsorbed water; although normally a weak oxidant, its reaction could be enhanced by removal of its reduction product, i.e. H₂, under vacuum. However, we did not observe any H₂ formation, and moreover the remaining amount of adsorbed water at 180°C is certainly quite small; therefore we do not favor this possibility. At 250°C, not much organic matter remains on the surface. Also interesting is what is *not* observed on silica: there is no evidence of the formation of unsaturated compounds with C=C double bonds, that would be formed by dehydration of ribose. Now the silica surface is moderately acidic

(with about 4.5 Si-OH surface groups per nm², of varying Brönsted acidity). Under dry conditions and with the possibility of acid catalysis, ribose could evolve all the way to furfural (a reaction, accompanied by the loss of three water molecules per ribose, that was evidenced as early as 1943⁴⁹), or stop at an intermediate dehydration step. In fact, investigations on the dehydration of the closely related xylose molecule have shown that the Brönsted acidic centers of silica were much less active than the Lewis acidic centers of silico-aluminas.⁵⁰ Yet the well-defined thermal event at 150° in TG suggests that ribose dehydration does occur in ribose/SiO₂. It is possible that the dehydration products do not stay on the surface and are quickly desorbed under the conditions of IR analysis (vacuum), while they burn in the air flow of the TG analysis.

In summary, cyclic ribose adsorbed on silica is stable up to about 150°C; this sets an upper limit on the conditions under which prebiotic scenarios involving this molecule could be invoked.

Divalent metal salts can definitely interact with ribose in a specific way. The interaction is minimal in aqueous solution, at least for the concentration we investigated: according to liquid-state ¹³C NMR, only very weak, outer-sphere interactions are established between ribose and metal salts (with the possible, and quite unexpected exception of Sr²⁺). The metal cations must be present as aqua complexes, and remain so as long as the water activity is high enough. As soon as drying removes water ligands, these cations establish rather strong interactions with ribose and may already cause significant transformations at the low temperature of 70°C. It is all but certain that every cation we tested is able to form specific complexes with ribose upon co-adsorption on silica. This is indicated by IR where the δ_{HCH} shifts betray a strong interaction of the C5 carbon with the metal through its C-O-H

moiety. IR does not allow to evaluate whether the other carbons are involved in the interaction (at least not in the wavenumber range accessible in our experimental conditions), but solid-state ^{13}C NMR clearly shows strong shifts of at least some of the other carbons, and we may conclude that ribose acts as a polydentate ligand. Establishing the precise stoichiometry and molecular structure of the resulting complexes goes beyond the aims of the present article and would require much additional work. In the solid state, some cations such as Ca^{2+} form 1-D coordination polymers with pentoses,⁵¹ but in view of the submonolayer density of ribose in our samples this does not seem likely, and the complexes formed on silica may have original structures.

The enantiomeric distribution of ribose in our samples is also interesting. In a previous communication, we had mentioned that the furanose isomers were more prominent in ribose/ SiO_2 than in water solution.²⁵ The tendency toward furanose stabilization is stronger in ribose-Mg/ SiO_2 and ribose-Ca/ SiO_2 (where they respectively account for 34 and 51% of total ribose, as compared to 24%). It is even more pronounced in ribose-Zn/ SiO_2 , with 64% of furanose isomers, but this sample is unique in favoring the β over the α isomer, while the opposite effect is observed with the other cations. The predominance of furanose is interesting since RNA exclusively uses a furanose form of ribose, which is not the predominant isomer in pure water solution.

The evolution of the anomeric ratio has been studied in the presence of borate^{6, 52, 53} and silicate^{8, 54} anions. In both cases, the use of borate or silicate during the formose reaction stabilized ribose, and more specifically its furanose forms. Ribose speciation evolved even more by association of borate and alkali or alkaline earth cations.⁵² The best result obtained was for the association of potassium and borate, which led to the formation of only

furanose isomers. Nevertheless, the use of borate has been disputed. The emergence of life has probably occurred around 3.7 Ga, but the oldest boron-containing mineral is probably only 3.6 Ga old.⁵⁵ Moreover, borates were probably not in sufficiently high concentration to be used in chemical reactions or to precipitate in order to allow prebiotic reactions at the interface.

The question of ribose anomeric speciation goes beyond furanose vs. pyranose. Today's RNA is more specifically constituted of the β -D-ribofuranose isomer and therefore the α vs. β distribution of ribose is also relevant. Recently, Singh et al.⁵⁶ studied the glycosylation of adenine in water/acetonitrile mixtures. They observed the preferential formation of a β -nucleotide and tried to rationalize this observation in a mechanism involving a nucleophilic attack of the adenine base on ribose with inversion of configuration, making the hypothesis that the approach of the nucleophilic base was favored by a specific pattern of H-bonding with the α_f ribose anomers. The details of the mechanism are likely to be different on the silica surface and insufficient molecular information is available to speculate on this, but the special behavior of Zn chloride, which favors the β anomer, would be worth investigating in glycosylation experiments.

Co-adsorption of inorganic salts causes striking modifications of the thermal reactivity of adsorbed ribose. We do not believe that interaction with the anion is the main factor, since we used the same compensating anion in all samples, and observed different behaviors depending on the nature of the cation. Already after drying at 70°C ring opening is observed with Mg^{2+} and Ca^{2+} . This isomerization to linear ribose could be catalyzed by coordination to the alkali metal cation. Beyond the reaction kinetics, the equilibrium (if it is indeed attained) does not favor the linear form, which remains a minority species and could

not be separately observed by NMR. Zn^{2+} and Sr^{2+} do not cause ring opening (see below for further discussion). Cu^{2+} and Fe^{x+} cause a more extensive transformation to the enediol form, probably due to their capacity to make coordination compounds with the latter.

Thermal activation under vacuum results in most cases in rather abrupt modifications of the IR spectrum at about 150°C , as on bare silica. With alkaline earth metals, unsaturated products appear resulting from ribose dehydration. For ribose-Mg/SiO₂, only weak carbonyl signals are observed, suggesting that furfural, the end product of complete ribose dehydration (with a loss of 3 H₂O per ribose), is not predominant. A possible explanation would be that carbons in the furanose cycle are dehydrated first (with a loss of up to 2 H₂O per ribose), while keeping the -CH₂OH group intact. However, this does not correspond with known dehydration mechanisms,⁵⁷ and besides TG shows that this sample loses more than 2 H₂O per ribose, not less, in the dehydration peak at 165°C . We have mentioned that IR data are compatible with transformation of ribose to furan; the calculated weight loss would be 5.5% (reported to the mass of SiO₂), in keeping with its quantification in TG. Furan can be obtained from furfural by decarbonylation although the catalysis of this transformation usually involves transition metals.

In contrast, for Ribose-Ca/SiO₂ and Ribose-Sr/SiO₂, a strong carbonyl peak appears at $1714\text{-}1716\text{ cm}^{-1}$ at the same time as the C=C bands, compatible with the formation of furfural. The latter molecule would coexist with furan, since the experimental weight losses fall between the theoretical values corresponding to furfural formation (-3.2% expected weight loss) and furan formation (-5.5%), while a minor amount of ribonolactone would be formed in a side reaction. The formation of furfural deserves some comments. Obtaining furfural from D-xylose (a pentose rather similar to D-ribose, itself derived from the

hydrolysis of hemicellulose) is a challenge in green chemistry. This reaction is usually carried out in slurries, and the effect of metal salt additives has been studied in some depth. An undesirable side reaction is the formation of polymeric humins from furfural condensation.⁵⁸ In our samples, when furfural is formed, it does not polymerize due to limited mobility on the silica surface, and therefore catalytic systems based on $\text{CaCl}_2/\text{SiO}_2$ or $\text{SrCl}_2/\text{SiO}_2$ could perhaps be applied for the industrial synthesis of furfural. At any rate, mechanistic insights gained on xylose transformation may also prove useful to understand ribose transformation,^{58, 59} even though the experiments are carried out in quite different environments (concentrated slurries instead of solid-vacuum interface). In particular, Enslow et al.⁵⁸ have proposed that ribose complexation through its C-OH groups can weaken the C-O bonds and thus facilitate dehydration, in a type of Lewis acid catalysis.

Ribose-Zn/SiO₂ undergoes the same transformations as ribose-Mg/SiO₂, but at a considerably higher temperature: cyclic ribose is intact at 150°C, it starts transforming to dehydration products at 180°C, and is extensively transformed, probably to furan, only at 200°C (this is compatible with T_{max} and weight loss observed in TG). Thus, from the point of view of ribose stabilization that was the driving force of the present study, co-adsorption with Zn^{2+} on silica is the most efficient treatment. It is crucial that Zn^{2+} prevents ring opening to linear ribose, because the formation of the latter intermediate, followed by isomerization to enediol, can easily result in further reactions e.g. to ribulose, arabinose, and thus presumably in loss of (pre) biological selectivity.

In the presence of copper (Cu^{2+}), ribose transformation follows a different path. As mentioned above, the $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ indicative of dehydration is not observed but a strong $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ band appears. The weight loss is smaller than for all other cations tested and occurs at a lower

temperature. The reaction that occurs could be a partial oxidation of the ribose skeleton. While a minor amount of ribose can be oxidized by residual O₂ in the vacuum ramp, the phenomenon that occurs here is more extensive and it is possible that Cu²⁺ itself acts as an oxidizing agent, thus playing the role of a reagent and not of a catalyst.

Phenomena observed with iron (Fe²⁺ and Fe³⁺) are complex. As mentioned, they involve ring opening at low temperatures and probably dehydration reactions at 150°C and higher under vacuum, without the formation of an aldehyde function. This reactivity is grossly similar to the one observed with Mg²⁺, yet the product formed does not have exactly the same spectroscopic signature. In TG conditions, i.e., under air flow, the reactivity seems noticeably different from vacuum conditions, in opposition to what is observed for the other systems: all the adsorbed ribose is removed in an exothermal reaction taking place at 200°C, meaning that the Fe^{x+} ions catalyze the combustion of ribose by dioxygen in the air. From a prebiotic point of view, this is less relevant than the reactivity under vacuum.

Conclusion :

With respect to bulk ribose, and even more to ribose in aqueous solutions, adsorption on silica results in stabilization of the cyclic molecules up to about 150°C, thus extending the useful "temperature window" for prebiotic reactions by more than 50°C; the anomeric speciation is just slightly modified with respect to the solution. At 150°C, ring opening starts to occur, and this is a doorway to pentose isomerization and loss of chemical specificity.

The alkaline earth and transition metal salts investigated here (MgCl_2 , CaCl_2 , SrCl_2 , CuCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 , ZnCl_2) show little tendency to interact with ribose in solution. However, when they are deposited together with ribose on the silica surface and submitted to drying, they form coordination complexes in which ribose acts as a multidentate ligand. The detailed structures of these complexes have not yet been resolved. Complexation influences the anomeric ratios, with the most remarkable effect being observed for Zn^{2+} , which favors the furanose forms and especially the β_f isomer.

The effects of inorganic salts on the thermal reactivity of ribose are very diverse depending on the chemical nature of the cations. Alkaline earth cations do not extend the temperature stability of ribose with respect to the salt-free system, and in fact they cause a minor amount of ring opening already at low temperature. At 150°C and above, they catalyze ribose dehydration leading to furfural and also, to variable extents, decarbonylation of the latter to furan. These reactions probably follow a Lewis acidic catalytic mechanism, and might be useful for the valorization of biomass-derived products.

Copper and iron ions cause a more extensive ring opening and isomerization at low temperature (to the enediol form). At higher temperatures, they initiate complicated reactions where their ability to take part in redox reactions, either as reagents or as catalysts, plays a role together with their Lewis acid catalytic properties. They certainly do not look promising to stabilize ribose at high temperatures.

In this respect, zinc appears special since it preserves cyclic ribose at least up to 180°C . While the present work may have applications other than prebiotic chemistry, from the latter point of view, it will be interesting to study the reactivity of ribose- Zn/SiO_2

systems in further reactions that might lead to RNA, namely glycosylation and phosphorylation processes.

Acknowledgments

Mariame Akouche was supported by a Ph.D. grant from the Ile-de-France region, under the DIM-ACAV program. The SESAME program of the French Ile de France Region is acknowledged for financial support to the purchase of the 500 MHz NMR spectrometer.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information.

References

1. Gilbert, W., Origins of Life - the RNA World. *Nature* **1986**, *319*.
2. Benner, S. A.; Kim, H.-J.; Carrigan, M. A., Asphalt, Water, and the Prebiotic Synthesis of Ribose, Ribonucleosides, and Rna. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (12), 2025-2034.
3. Shapiro, R., Prebiotic Ribose Synthesis: A Critical Analysis. **1988**, *18* (1-2), 71-85.
4. Larralde, R.; Robertson, M. P.; Miller, S. L., Rates of Decomposition of Ribose and Other Sugars: Implications for Chemical Evolution. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **1995**, 8158-8160.
5. Sisak, D.; McCusker, L. B.; Zandomenighi, G.; Meier, B. H.; Bläser, D.; Boese, R.; Schweizer, W. B.; Gilmour, R.; Dunitz, J. D., The Crystal Structure of D-Ribose—at Last! *Angew. Chem.* **2010**, *49*, 4503–4505.
6. Ricardo, A.; Carrigan, M. A.; Olcott, A. N.; Benner, S. A., Borate Minerals Stabilize Ribose. *Science* **2003**, *63* (5655), 96-96.
7. Kim, H.-J.; Ricardo, A.; Illangkoon, H. I.; Kim, M. J.; Carrigan, M. A.; Frye, F.; Benner, S. A., Synthesis of Carbohydrates in Mineral-Guided Prebiotic Cycles. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9457-9468.
8. Lambert, J. B.; Lu, G.; Singer, S. R.; Kolb, V. M., Silicate Complexes of Sugars in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9611-9625.
9. Vázquez-Mayagoitia, A.; Horton, S. R.; Sumpter, B. G.; Sponer, J.; Sponer, J. E.; Fuentes-Cabrera, M., On the Stabilization of Ribose by Silicate Minerals. *Astrobiol.* **2011**, *11* (2), 115-121.
10. Bernal, D., *The Physical Basis of Life*. Routledge & Kegan ed.; London, 1951.
11. Lambert, J.-F., Adsorption and Polymerization of Amino Acids on Mineral Surfaces: A Review. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2008**, *38* (3), 211-242.

12. Balme, S.; Guegan, R.; Janot, J.-M.; Lepoitevin, M.; Jaber, M.; Dejardin, P.; Bourrat, X.; Motelica-Heino, M., Structure, Orientation and Stability of Lysozyme Confined in Layered Materials. *Soft Mat.* **2013**, *9* (11), 3188-3196.
13. Lepoitevin, M.; Jaber, M.; Guegan, R.; Janot, J. M.; Dejardin, P.; Henn, F.; Balme, S., Bsa and Lysozyme Adsorption on Homoionic Montmorillonite: Influence of the Interlayer Cation. *Appl. Clay Sci.* **2014**, *95*, 396-402.
14. Ferris, J. P.; Hill, A. R. J.; Liu, R.; Orgel, L. E., Synthesis of Long Prebiotic Oligomers on Mineral Surfaces. *Nature* **1996**, *381*, 59-61.
15. Meng, M.; Stievano, L.; Lambert, J.-F., Adsorption and Thermal Condensation Mechanisms of Amino Acids on Oxide Supports. 1. Glycine on Silica. *Langmuir* **2004**, *20*, 914-923.
16. Stievano, L.; Piao, L.; Lopes, I.; Meng, M.; Costa, D.; Lambert, J.-F., Glycine and Lysine Adsorption and Reactivity on the Surface of Amorphous Silica. *Eur. J. Mineral.* **2007**, *19* (3), 321-331.
17. Lopes, I.; Piao, L.; Stievano, L.; Lambert, J.-F., Adsorption of Amino Acids on Oxide Supports: A Solid-State NMR Study of Glycine Adsorption on Silica and Alumina. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (42), 18163-18172.
18. Lambert, J.-F.; Stievano, L.; Lopes, I.; Gharsallah, M.; Piao, L., The Fate of Amino Acids Adsorbed on Mineral Matter. *Planet. Space Sci.* **2009**, *57* (4), 460-467.
19. Bouchoucha, M.; Jaber, M.; Onfroy, T.; Lambert, J.-F.; Xue, B., Glutamic Acid Adsorption and Transformations on Silica. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115* (44), 21813-21825.
20. Jaber, M.; Spadavecchia, J.; Bazzi, H.; Georgelin, T.; Costa-Torro, F.; Lambert, J.-F., Non-Biological Selectivity in Amino Acids Polymerization on TiO₂ Nanoparticles. *Amino Acids* **2013**, *45* (2), 403-406.
21. Lambert, J.-F.; Jaber, M.; Georgelin, T.; Stievano, L., A Comparative Study of the Catalysis of Peptide Bond Formation by Oxide Surfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (32), 13371 - 13380.
22. Georgelin, T.; Jaber, M.; Bazzi, H.; Lambert, J.-F., Formation of Activated Biomolecules by Condensation on Mineral Surfaces – a Comparison of Peptide Bond Formation and Phosphate Condensation. *Orig. Life Evol. Biosphere* **2013**, *43* (4-5), 429-443.
23. Georgelin, T.; Jaber, M.; Onfroy, T.; Hargrove, A.-A.; Costa-Torro, F.; Lambert, J.-F., Inorganic Phosphate and Nucleotides on Silica Surface: Condensation, Dismutation and Phosphorylation. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (24), 12579–12590.
24. Jaber, M.; Georgelin, T.; Bazzi, H.; Costa-Torro, F.; Lambert, J.-F.; Bolbach, G.; Clodic, G., Coadsorption and Selective Peptidic Condensation in the (Arginine + Glutamic Acid) / Montmorillonite Clay System. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (44), 25447–25455.
25. Georgelin, T.; Jaber, M.; Fournier, F.; Laurent, G.; Costa-Torro, F.; Maurel, M.-C.; Lambert, J.-F., Stabilization of Ribofuranose by a Mineral Surface. *Carbohydr. Res.* **2015**, *402*, 241-244.
26. Raemy, A.; Schweizer, T. F., Thermal Behaviour of Carbohydrates Studied by Heat Flow Calorimetry. *J. Therm. Anal.* **1983**, *28*, 95-108.
27. Tomasik, P.; Palasinski, M.; Wiejak, S., The Thermal Decomposition of Carbohydrates .1. The Decomposition of Monosaccharides, Disaccharides and Oligosaccharides. *Adv. Carb. Chem. Biochem.* **1989**, *47*, 203-278.
28. Roos, Y., Melting and Glass Transitions of Low Molecular Weight Carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **1993**, *238*, 39-48.
29. Hurttä, M.; Pitkänen, I.; Knuutinen, J., Melting Behaviour of D-Sucrose, D-Glucose and D-Fructose. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*.
30. Beckett, S. T.; Francesconi, M. G.; Geary, P. M.; Mackenzie, G.; Maulny, A. P. E., Dsc Study of Sucrose Melting. *Carb. Res.* **2006**, *341*, 2591–2599.

31. Magon, A.; Pyda, M., Melting, Glass Transition, and Apparent Heat Capacity of A-D-Glucose by Thermal Analysis. *Carb. Res.* **2011**, *346*, 2558–2566.
32. Lee, J. W.; Thomas, L. C.; Schmidt, S. J., Investigation of the Heating Rate Dependency Associated with the Loss of Crystalline Structure in Sucrose, Glucose, and Fructose Using a Thermal Analysis Approach (Part I). *J. Agr. Food. Chem.* **2011**, *59*, 684–701.
33. Izawa, M. R. M.; Nesbitt, H. W.; MacRae, N. D.; Hoffman, E. L., Composition and Evolution of the Early Oceans: Evidence from the Tagish Lake Meteorite. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2010**, *298*, 443–449.
34. Wächtershäuser, G., Pyrite Formation, the First Energy Source for Life: A Hypothesis. *System. Appl. Microbiol.* **1988**, *10*, 207-210.
35. Mulkidjanian, A. Y., On the Origin of Life in the Zinc World: 1. Photosynthesizing, Porous Edifices Built of Hydrothermally Precipitated Zinc Sulfide as Cradles of Life on Earth. *Biology Direct* **2009**, *4*, #26.
36. Ramos-Sanchez, M. C.; Rey, F. J.; M.L. Rodriguez-Mendez, F. J. M.-G.; Martin-Gil, J., DTG and DTA Studies of Typical Sugars. *Thermochim. Acta* **1988**, *134*, 55-60.
37. Räisänen, U.; Pitkänen, I.; Halttunen, H.; Hurtta, M., Formation of the Main Degradation Compounds from Arabinose, Xylose, Mannose and Arabinitol During Pyrolysis. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2003**, *72*, 481–488.
38. Lappalainen, M.; Pitkänen, I.; Heikkilä, H.; Nurmi, J., Melting Behaviour and Evolved Gas Analysis of Xylose. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2006**, *84* (2), 367-376.
39. Mathlouthi, M.; Seuvre, A.-M.; Koenig, J. L., F.T.-I.R. And Laser-Raman Spectra of D-Ribose and 2-Deoxy-D-Erythro-Pentose (“2-Deoxy-D-Ribose”). *Carb. Res.* **1983**, *122*, 31-47.
40. Yaylayan, V. A.; Ismail, A. A., Determination of the Effect of Temperature on the Concentration of Keto Form of D-Fructose by FT-IR Spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **1992**, *11* (2), 149-158.
41. Zhuravlev, L. T., The Surface Chemistry of Amorphous Silica. Zhuravlev Model. *Coll. Surf. A* **2000**, *173*, 1-38.
42. Rajh, T.; Chen, L. X.; Lukas, K.; Liu, T.; Thurnauer, M. C.; Tiede, D. M., Surface Restructuring of Nanoparticles: An Efficient Route for Ligand-Metal Oxide Crosstalk. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 10543-10552.
43. Kwiatkowski, J. S.; Leszczynski, J.; Teca, I., Molecular Structure and Infrared Spectra of Furan, Thiophene, Selenophene and Their 2,5-N and 3,4-N Derivatives: Density Functional Theory and Conventional Post-Hartree-Fock MP2 Studies. *J. Mol. Struct.* **1997**, *436-437*, 451-480.
44. Johnson, T. J.; Sams, R. L.; Profeta, L. T. M.; Akagi, S. K.; Burling, I. R.; Yokelson, R. J.; Williams, S. D., Quantitative Ir Spectrum and Vibrational Assignments for Glycolaldehyde Vapor: Glycolaldehyde Measurements in Biomass Burning Plumes. *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 4096–4107.
45. Holm, M. S.; Pagán-Torres, Y. J.; Saravanamurugan, S.; Riisager, A.; Dumesic, J. A.; Taarning, E., Sn-Beta Catalysed Conversion of Hemicellulosic Sugars. *Green Chem.* **2012**, *14*, 702-706.
46. Ortiz, P.; Fernández-Bertrán, J.; Reguerac, E., Role of the Anion in the Alkali Halides Interaction with D-Ribose: A ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopy Study. *Spectrochim. Acta A* **2005**, *61*, 1977–1983.
47. Rodriguez-Garcia, M.; Surman, A. J.; Cooper, G. J. T.; Suárez-Marina, I.; Hosni, Z.; Lee, M. P.; Cronin, L., Formation of Oligopeptides in High Yield under Simple Programmable Conditions. *Nature Com.* **2015**, *6*, Art. #8385.

48. Kolb, V. M., On the Applicability of Solventless and Solid State Reactions to the Meteoritic Chemistry. *Int. J. Astrobiol.* **2012**, *11* (1), 43-50.
49. Hockett, R. C.; Guttag, A.; Smith, M. E., The Production of Furfural from D-Lyxose and D-Ribose. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65* (1), 1-3.
50. You, S. J.; Kim, Y. T.; Park, E. D., Liquid-Phase Dehydration of D-Xylose over Silica–Alumina Catalysts with Different Alumina Contents. *React. Kinet. Mech. Cat.* **2014**, *111*, 521–534.
51. Black, C. B.; Huang, H.-W.; Cowan, J. A., Biological Coordination Chemistry of Magnesium, Sodium, and Potassium Ions. Protein and Nucleotide Binding Sites. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *135/136*, 165-202.
52. Amaral, A. F.; M. Matilde Marques; da Silva, J. L.; Fraústo da Silva, J. J. R., Interactions of D-Ribose with Polyatomic Anions, and Alkaline and Alkaline-Earth Cations: Possible Clues to Environmental Synthesis Conditions in the Pre-RNA World. *New J. Chem.* **2008**, *32*, 2043-2049.
53. Furukawa, Y.; Horiuchi, M.; Kakegawa, T., Selective Stabilization of Ribose by Borate. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2013**, *43*, 353–361.
54. Lambert, J. B.; Gurusamy-Thangavelu, S. A.; Ma, K., The Silicate-Mediated Formose Reaction: Bottom-up Synthesis of Sugar Silicates. *Science* **2010**, *327*, 984-986.
55. Hazen, R. M.; Bekker, A.; Bish, D. L.; Bleeker, W.; Downs, R. T.; Farquhar, J.; Ferry, J. M.; Grew, E. S.; Knoll, A. H.; Papineau, D.; Ralph, J. P.; Sverjensky, D.; Valley, J. W., Needs and Opportunities in Mineral Evolution Research. *Amer. Mineral.* **2011**, *96*, 953–963.
56. Singh, P.; Singh, A.; Kaura, J.; Holzer, W., H-Bond Activated Glycosylation of Nucleobases: Implications for Prebiotic Nucleoside Synthesis. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 3158–3161.
57. Wang, M.; Liu, C.; Li, Q. B.; Xu, X. X., Theoretical Insight into the Conversion of Xylose to Furfural in the Gas Phase and Water. *J. Mol. Model.* **2015**, *21* (296-305).
58. Enslow, K. R.; Bell, A. T., The Role of Metal Halides in Enhancing the Dehydration of Xylose to Furfural. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 479-489.
59. Danon, B.; Marcotullio, G.; de Jong, W., Mechanistic and Kinetic Aspects of Pentose Dehydration Towards Furfural in Aqueous Media Employing Homogeneous Catalysis. *Green Chem.* **2014**, *16*, 39-54.

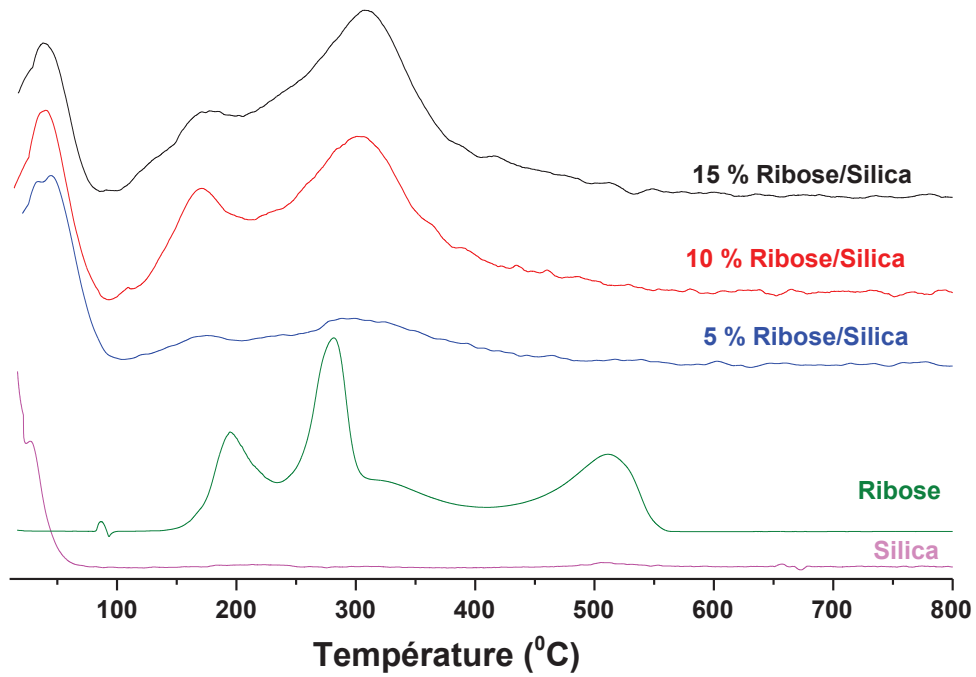
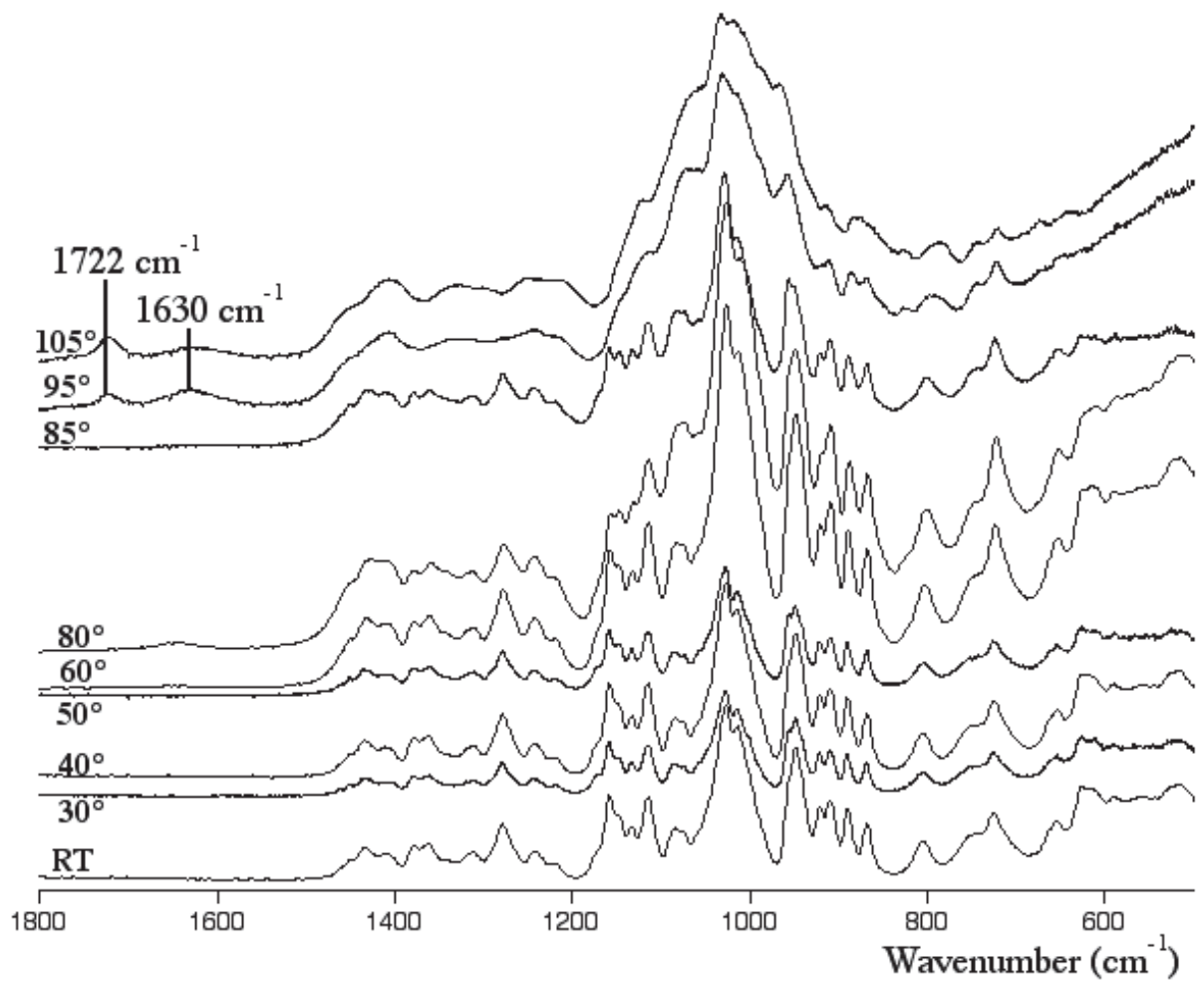


Figure 1: DTG traces of the silica support, of bulk Ribose, and of samples 5% Ribose/SiO₂, 10% Ribose/SiO₂, and 15% Ribose/SiO₂.



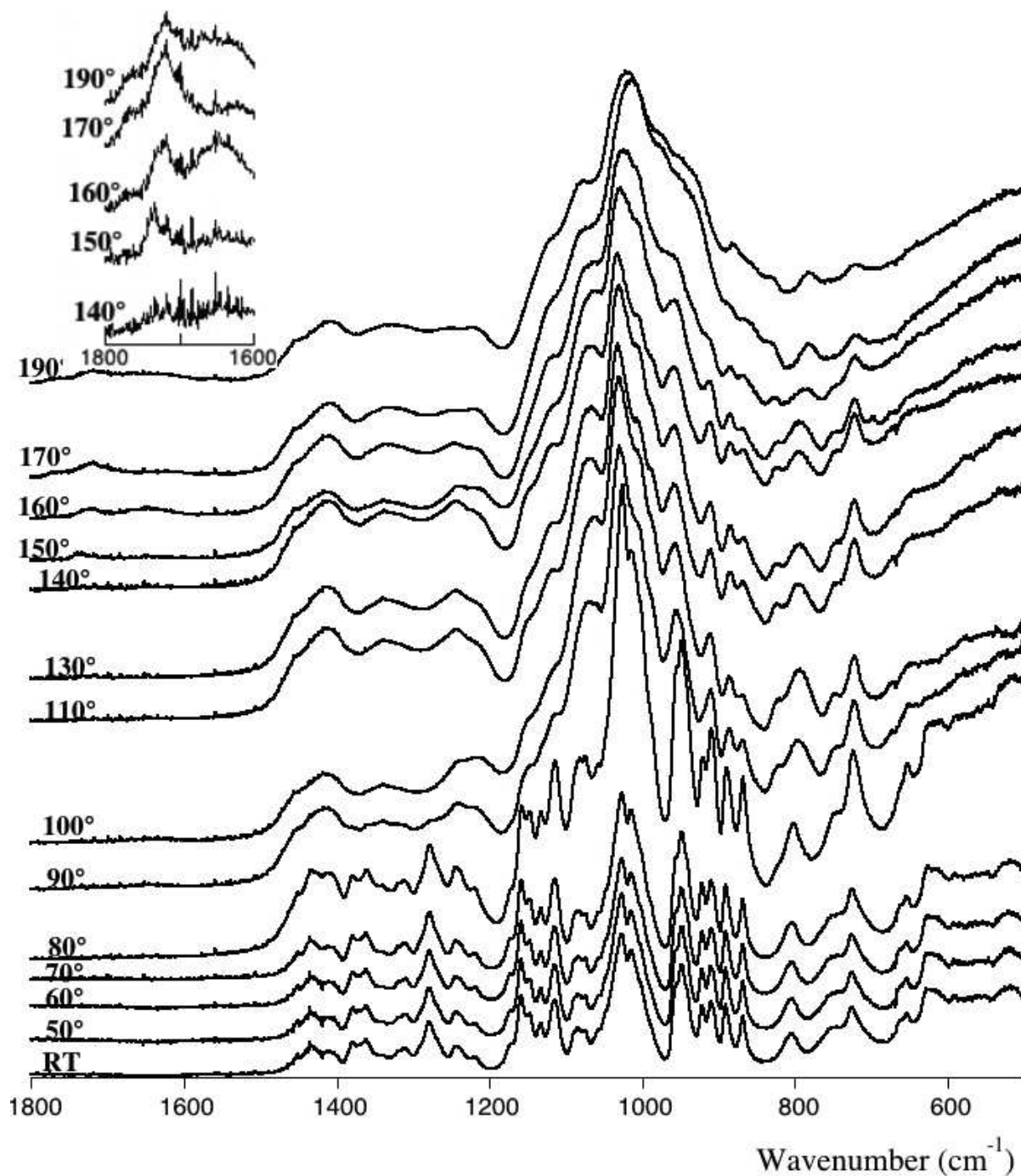


Figure 2. Influence of heating under air on IR-ATR of bulk D-ribose. A: quick heating of 0.1 mg of D-ribose; B: progressive heating of 5 mg of D-Ribose.

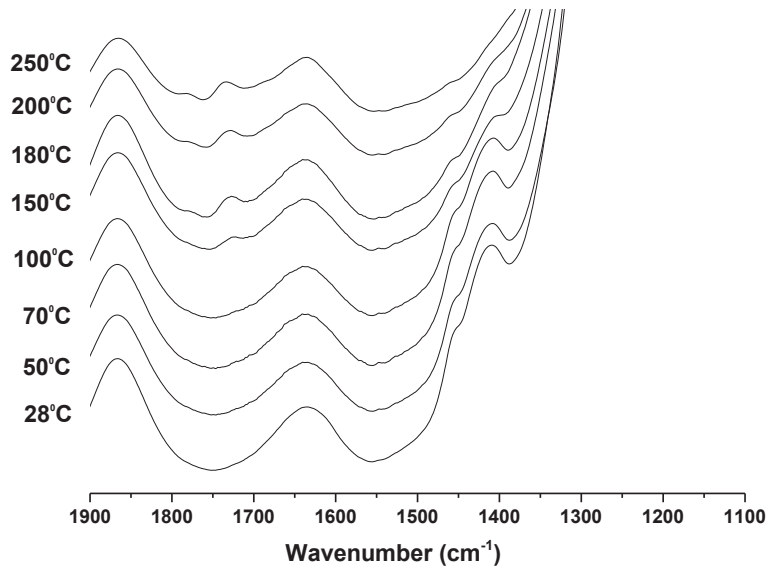


Figure 3 : IR of 10% Ribose/SiO₂ activated under vacuum up to 250°C.

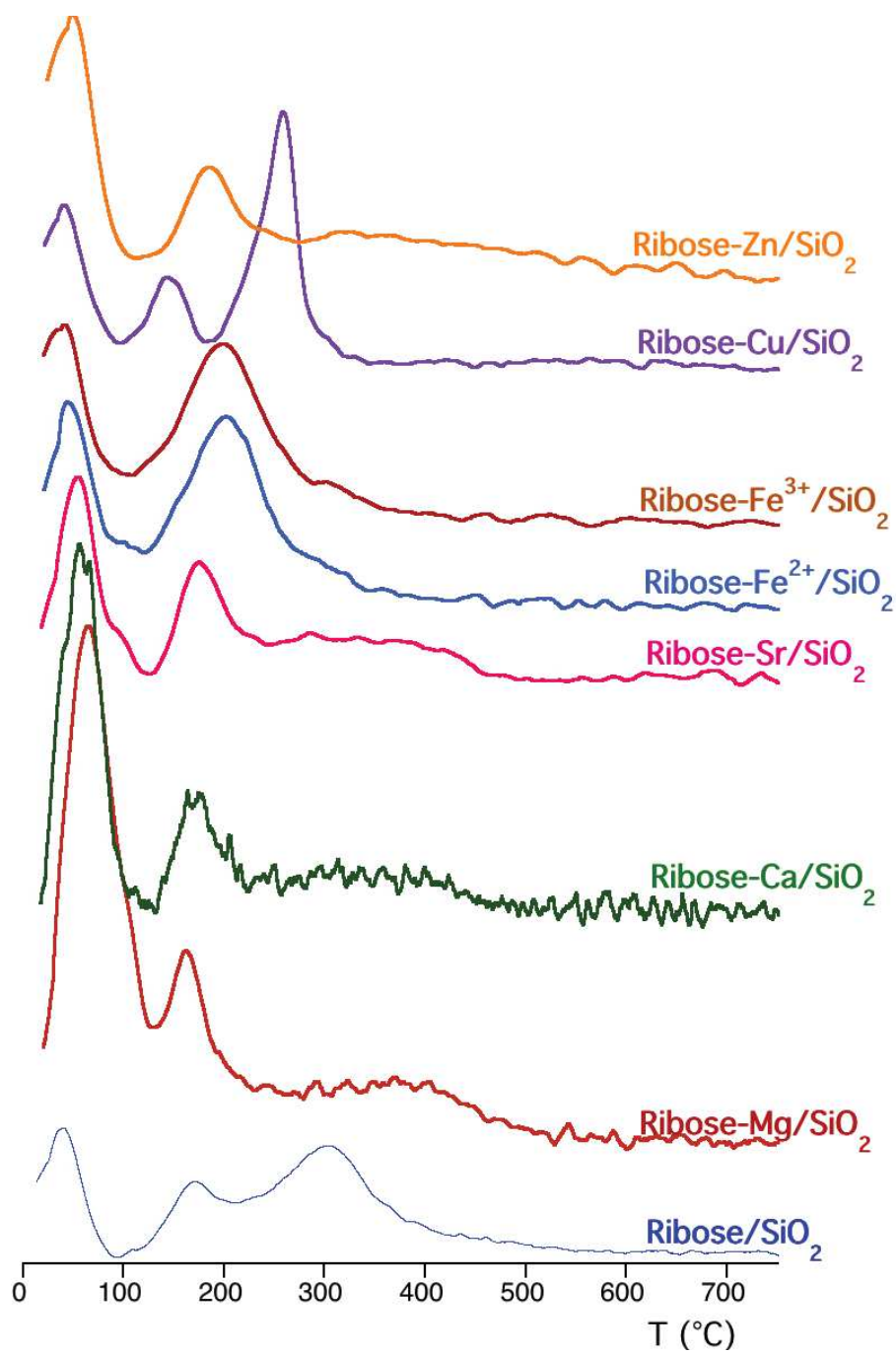


Figure 4: DTG traces of Ribose-metal/SiO₂ samples

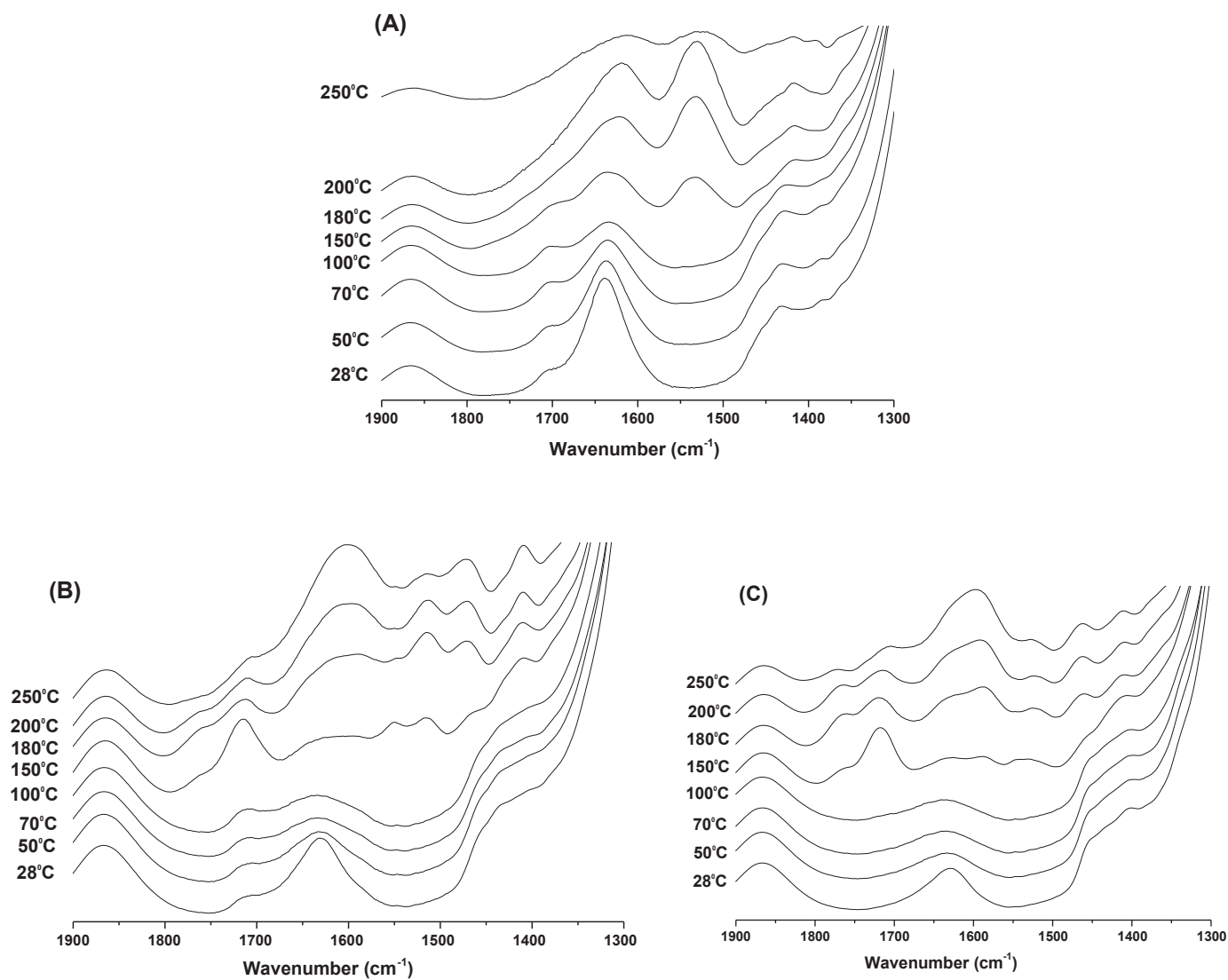


Figure 5: IR spectra as a function of activation temperature of Ribose-Mg/SiO₂ (A), Ribose-Ca/ SiO₂ (B) and Ribose-Sr/ SiO₂ (C), with (1:1) molar equivalent.

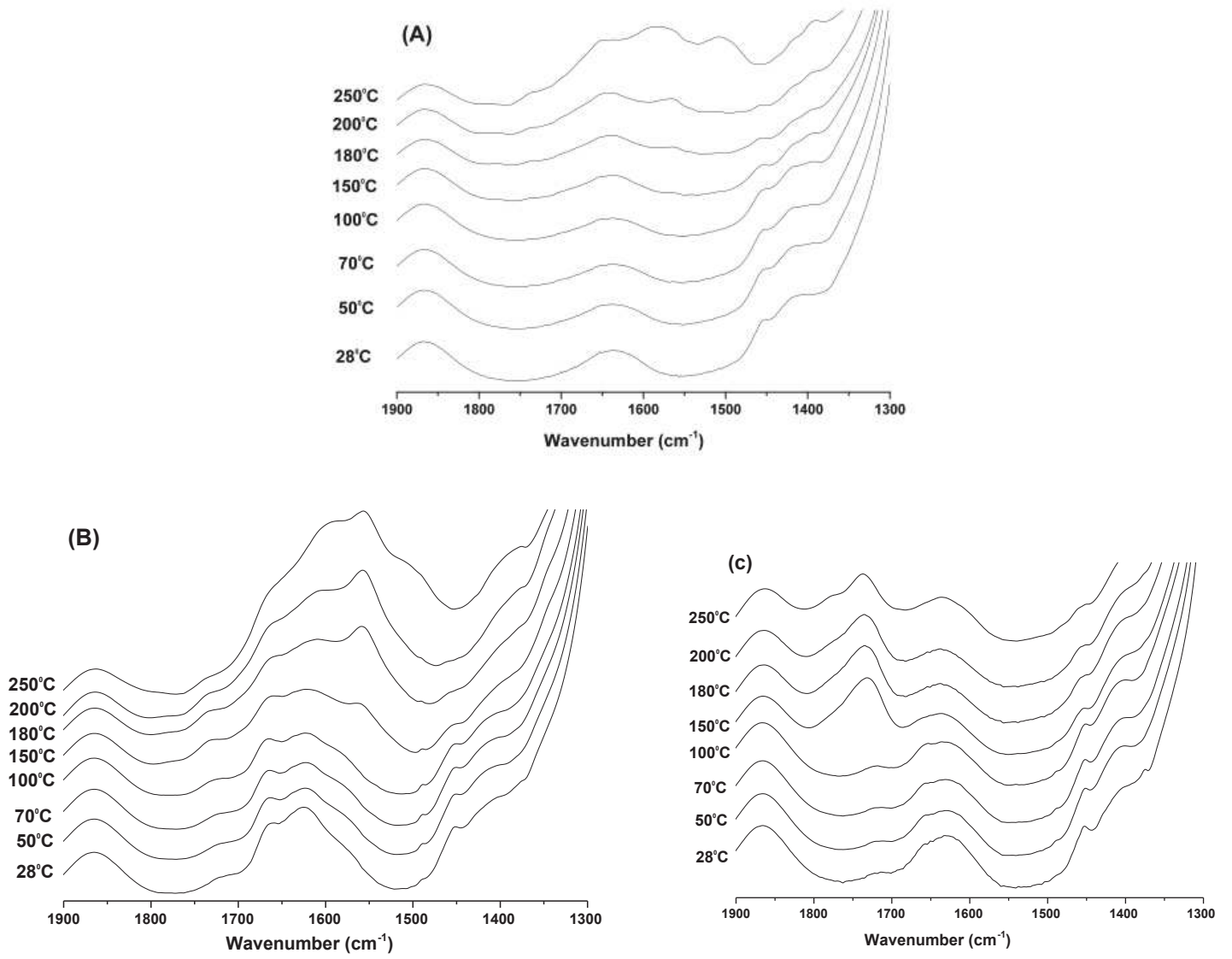


Figure 6: IR spectra as a function of activation temperature of Ribose-Zn/SiO₂ (A), Ribose-Fe/ SiO₂ (B) and Ribose-Cu/ SiO₂ (C), with (1:1) molar equivalent.

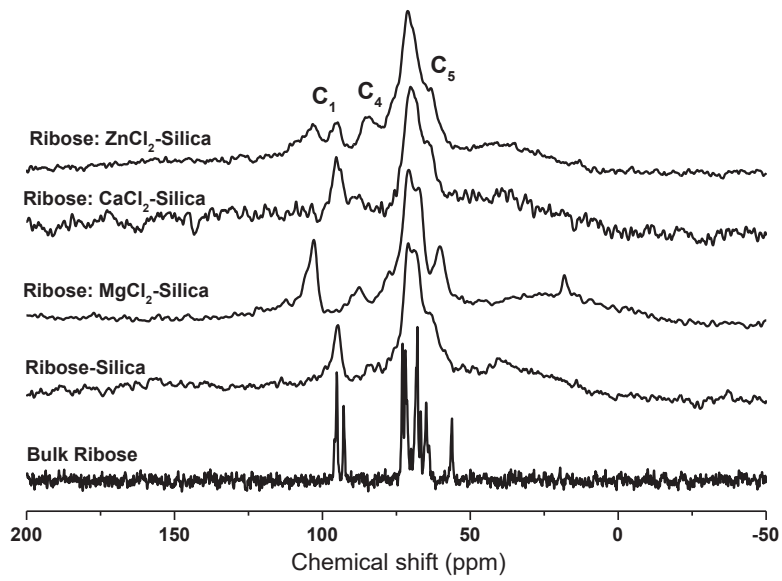


Figure 7: ^{13}C NMR of bulk ribose, Ribose/ SiO_2 , and Ribose-diamagnetic Metal/ SiO_2 systems

C. Conclusions

L'adsorption du D-ribose sur la surface de la silice a provoqué une augmentation de 25% de sa forme α -furanose. Cette augmentation est intéressante dans la mesure où la réaction de glycosylation provoque une inversion anomérique de la forme α en β -furanose: ce point sera plus développé au Chapitre IV. La stabilisation thermique du ribose-SiO₂ jusqu'à 150°C rend plus "robustes" les scénarios de chimie prébiotique puisque la gamme de températures "utilisables" s'étend bien au-delà de 50°C. A partir de 150°C, on commence à observer l'ouverture du cycle du ribose ce qui le rend plus réactif et peut aboutir à la perte de sa spécificité chimique.

D'après la littérature, le ribose est capable de complexer certains cations. Cette complexation pourrait éventuellement induire une structuration tridimensionnelle de l'ARN et l'ADN. Les résultats obtenus en infrarouge in situ d'échantillons de ribose co-adsorbés avec des cations sur de la silice sont particulièrement intéressants. En effet, ils permettent de constater que la présence et la nature du cation influent sur la réactivité thermique du sucre.

Plus précisément, les alcalino-terreux conduisent tout d'abord à la formation de furfural en catalysant la déshydratation du ribose. Ensuite, le furfural formé subit une décarbonylation. Il se transforme en furane.

Par contre dans le cas du cuivre et du fer, on observe une ouverture du cycle et une isomérisation à basse température (formation d'ènediol). A des températures plus élevées, ils initient des réactions plus complexes impliquant à la fois leur caractère redox et leur caractère acide en tant qu'acide de Lewis. Ces deux sels ne semblent donc pas prometteurs pour la stabilisation du ribose à hautes températures.

Seul le zinc entraîne une stabilisation du ribose sous sa forme cyclique jusqu'à 200°C ce qui montre tout l'intérêt d'étudier plus précisément les complexes Ribose-Zn²⁺. Un schéma récapitulatif de l'ensemble des résultats obtenus est présenté ci-dessous :

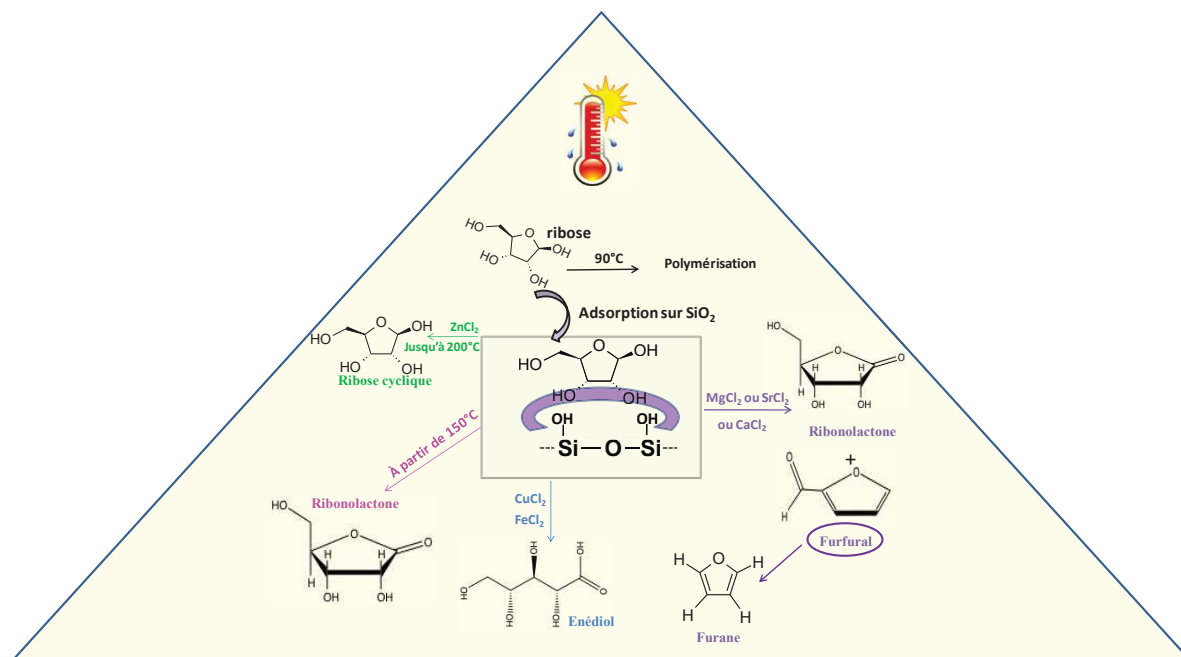


Figure IV-1: Schéma récapitulatif de la réactivité du ribose massique et du ribose adsorbé à la surface de la silice en présence et en absence de sels inorganiques.

La nature des complexes formés n'a pas encore été élucidée. Il est probable que la différence de réactivité entre les différents cations soit liée à la stabilité du cycle du ribose à travers le processus de complexation. La formation du furfural ne nécessite pas l'ouverture du cycle alors que la formation de la lactone passe par une étape d'oxydation de la fonction carbonyle du ribose linéaire. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que l'interaction ribose-alcalino-terreux est forte. Elle empêche ainsi l'ouverture du cycle lors du chauffage. N'ayant pas de fonction à oxyder, la déshydratation amène donc à la formation d'un furfural. La complexation a influé aussi sur la répartition anomérique du ribose, surtout en présence de zinc. Ce dernier favorise la forme furanose et particulièrement l'isomère β -ribofuranose.

Chapitre IV

Phosphorylation et glycosylation sur la silice

V. Chapitre IV : phosphorylation et glycosylation du ribose adsorbé sur la silice

A. Adsorption de KH_2PO_4 / SiO_2

Le but de cette partie est d'étudier la formation des polyphosphates sur la surface de la silice. L'étude de la formation des polyphosphates est doublement importante et pertinente dans un contexte prébiotique. En effet, en plus d'être vitaux dans le métabolisme, les voies de synthèse des polyphosphates ne sont pas encore élucidées ni en milieu aqueux ni en phase solide (chapitre I). Après adsorption de KH_2PO_4 (Pi) par IHN avec différentes densités massiques en phosphates (3, 5, 7 et 10% de KH_2PO_4 par unité massique de silice), les échantillons ont été analysés par ATG, DRX et RMN.

I. Diffraction des rayons X (DRX)

La figure V-1 A présente les diffractogrammes de Rayons X des échantillons Pi / SiO_2 . Ils ne montrent aucun pic de diffraction fin qui indiquerait la présence d'une phase cristalline, ce qui suggère que tous les ions phosphates sont dispersés à la surface de la silice.

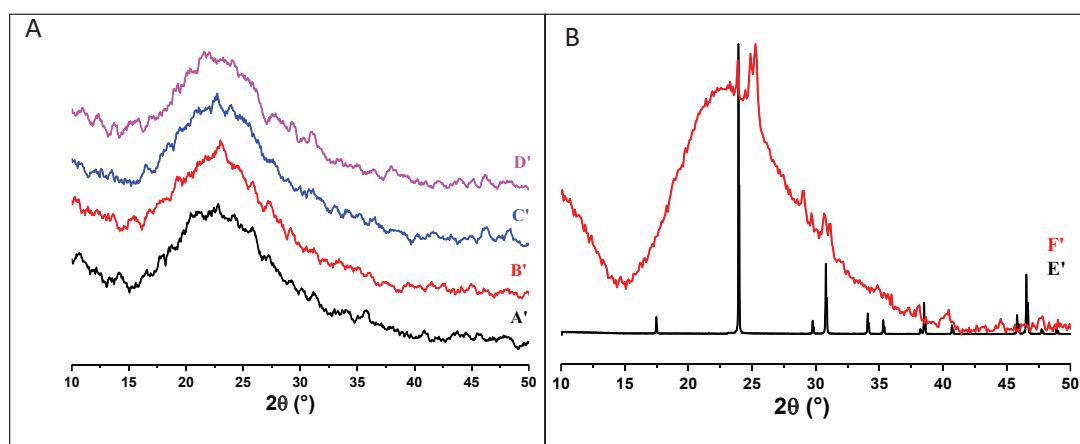


Figure V-1 : diffractogrammes de Rayons X de x% Pi/ SiO_2 avec x = 3 (A'), 5 (B'), 7 % (C') et deux échantillons de x = 10% (D'et F') comparé au KH_2PO_4 massique (E').

La figure V-1 B présente le diffractogramme d'un deuxième échantillon de 10% Pi / SiO_2 préparé par IHN selon une procédure identique, avec la même quantité d'eau et la même durée de séchage, dans une étude de reproductibilité. On observe clairement des pics caractéristiques du KH_2PO_4 massique, mais aussi d'une seconde phase non identifiée.

II. Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les courbes DTG des mêmes échantillons de x% Pi / SiO₂ sont présentées dans la figure V-2.

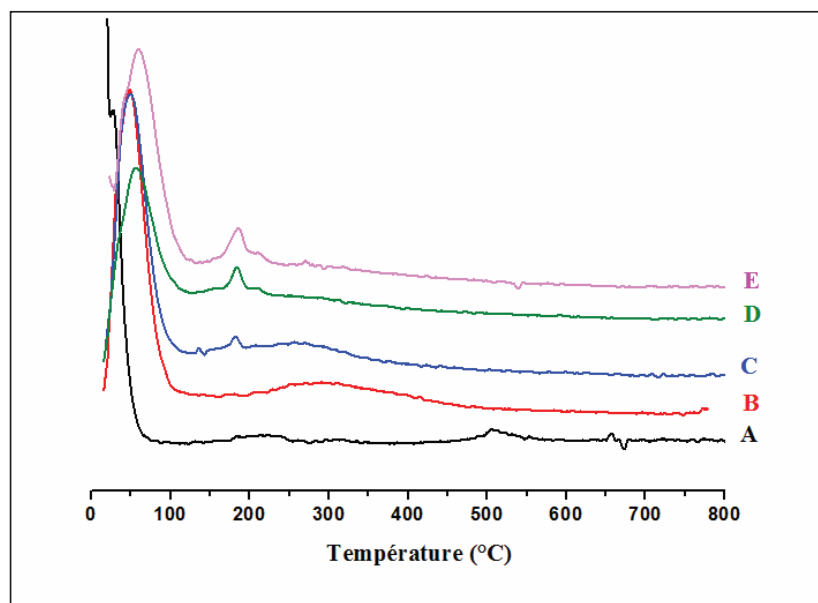


Figure V-2: DTG de x% Pi / SiO₂ avec x= 0 (A) , 3 (B) , 5 (C), 7 (D) et 10% (E).

Les DTG de tous les échantillons montrent une première perte de masse endothermique (d'après les courbes de flux de chaleur, non présentées) à une température inférieure à 100°C liée à la perte d'eau physisorbée. A des températures plus élevées, la courbe DTG de la silice (0%Pi-SiO₂) montre une perte de masse continue entre 100 et 600°C sans maximum bien défini, qui pourrait être attribuée à la condensation des silanols de surface.¹

Sur les seuls échantillons 3 et 5% Pi / SiO₂, on observe des pics larges et exothermiques à hautes températures, centrés vers 310 et 265°C, respectivement. D'autre part, on commence à observer un pic fin à une température plus basse, $T_{\max} = 182^{\circ}\text{C}$, à partir d'une densité massique de 5%. Comme expliqué dans la partie bibliographique (chapitre 1), ce pic caractérise la condensation des phosphates à une température plus basse que celle du phosphate massique, par un effet catalytique de la surface de la silice. Enfin, pour les échantillons les plus chargés (7% et 10% Pi), ce pic comporte un épaulement à $T_{\max} = 210^{\circ}\text{C}$. Les pourcentages de perte de masse ont été évalués dans la région qui nous intéresse : à $T \leq 120^{\circ}\text{C}$, il s'agit de l'élimination de l'eau physisorbée (Tableau IV-1). La quantification de cet évènement sera utile par la suite pour la discussion de la spéciation des phosphates supportés.

Tableau V-1 : Rapport entre la quantité d'eau physisorbée et la quantité de phosphates pour les échantillons x % Pi /SiO₂ après séchage.

% Pi	% H ₂ O physisorbé	rapport H ₂ O _{phys} / Pi
3,0	4,9	12,3
5,0	4,3	6,5
7,0	2,5	2,7
10	4,2	3,2

Le tableau V-2 reprend les pertes massiques associées aux évènements à températures plus élevées. Comme certains de ces évènements pourraient être associés à des réactions de condensation des P-OH des phosphates (chacun libérant une molécule d'eau), on a calculé les équivalents des pertes de masse en nombre de molécules d'eau libérées par unité phosphate dans l'échantillon. Enfin, on donne en regard les pourcentages théoriques de perte d'eau qui correspondraient à la transformation totale des monophosphates en pyrophosphate, ainsi qu'en polymétaphosphates.

Tableau V-2 : TG des échantillons x % Pi /SiO₂ après séchage, quantifications des évènements à températures moyennes et élevées.

x% Pi /SiO ₂	Température (°C)	% perte Massique	Equivalent en moles H ₂ O par Pi	% de perte calculé pour pyro-P	% de perte calculé pour poly-P
3%	130-190°C	0,33	0.84	0,19	0,39
	190-476°C	1,9	4.87		
5%	124-196°C	0,58	0.87	0,33	0,66
	196-438°C	1,53	2.3		
7%	125-233°C	0,87	0.94	0,46	0,92
10%	134-247 °C	0,91	0.7	0,66	1,32

Les évènements larges à températures élevées correspondent à des pertes de masse nettement trop élevées pour être expliquées par des réactions de condensation. Les pics fins correspondent dans tous les cas à des pertes de masse compatibles avec une condensation partielle.

III. RMN de ^{31}P

III.I RMN de ^{31}P du KH_2PO_4 massique

Le spectre 1-pulse du phosphate massique montre la présence d'un seul pic large centré à 4,1 ppm. De façon inattendue, le même produit donne en CP $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ un signal beaucoup plus fin, présentant clairement deux maxima à + 3,9 et + 4,1 ppm (Figure IV-3).

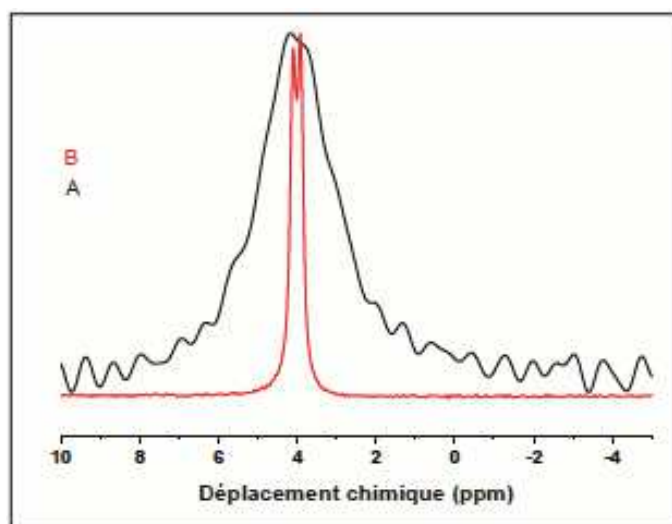


Figure V-3 : RMN de ^{31}P , 1-pulse (A) et CP $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ (B) de KH_2PO_4 .

Ce résultat pourrait indiquer que nous avons deux environnements cristallins différents pour les ions dihydrogénophosphate dans la structure de KH_2PO_4 . Nous ne disposons pas d'une description détaillée de la structure cristalline de ce composé qui permettrait de confirmer cette conclusion ; il faudra se souvenir en tout cas que le signal caractéristique de cette phase peut être très différent en 1-pulse ou en CP.

III.II RMN 1-pulse de ^{31}P , $\text{P}_i / \text{SiO}_2$

La Figure V-4 compare les spectres RMN du phosphore après adsorption à la surface de la silice et séchage à 70°C (5, 7 et 10% $\text{P}_i / \text{SiO}_2$) et après activation thermique sous flux d'air à 130°C pendant 3 heures (10% $\text{P}_i / \text{SiO}_2$ seulement). Le signal de KH_2PO_4 massique est repris pour référence.

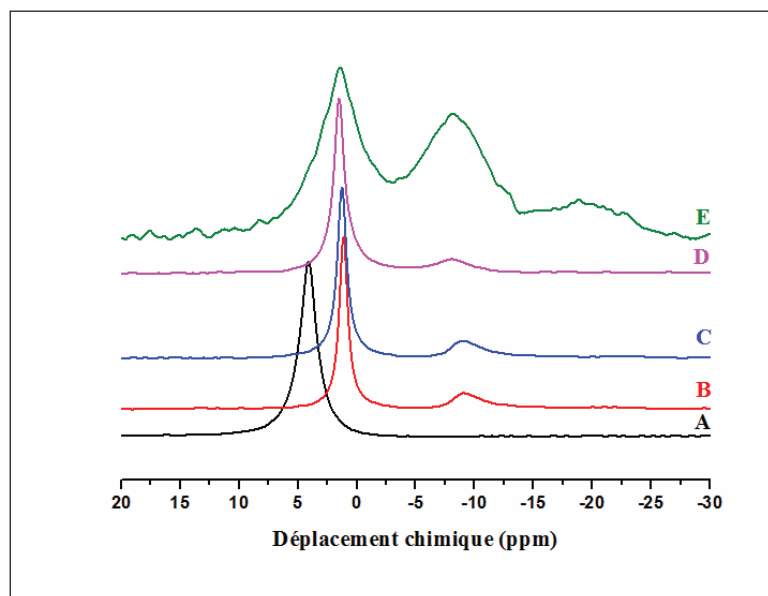


Figure V-4 : RMN ^{31}P 1-pulse de KH_2PO_4 massique (A), des échantillons $x\%\text{Pi-SiO}_2$ séchés à 70°C avec $x=5$ (B), 7 (C) et 10% (D) séchés à 70°C et de 10% Pi-SiO_2 activé à 130°C pendant 3h (E).

Pour cette série d'échantillons, le signal du phosphate massique n'est jamais observé, ce qui est en accord avec la DRX sur la même série. Après adsorption à la surface de la silice, un signal dans la région des Q^0 (monophosphates) est observé mais à des déplacements chimiques plus faibles que dans le cas du phosphate massique. Il est centré à 1,1 ppm pour 5% et 7% Pi/SiO_2 et à 1,5 ppm pour 10% Pi/SiO_2 . Un deuxième pic moins intense que le pic principal apparaît dans la région des Q^1 . Le phosphate adsorbé à la surface de la silice est donc sous forme de mono- et diphosphates après séchage à 70°C .

Après activation thermique à 130°C , les pics du monophosphate (Q^0) et du diphosphate (Q^1) deviennent plus larges, ce qui indique que les espèces sont peu mobiles, et l'intensité relative du pic Q^1 augmente. En même temps, un nouvel environnement de phosphate apparaît dans la région des Q^2 . Donc, l'activation thermique à 130°C provoque la condensation de phosphates en di- et polyphosphates.

Les décompositions des différents spectres sont présentées dans la figure V-5. Comme la RMN 1-pulse est une méthode d'analyse quantitative, les quantifications de ces décompositions sont rassemblées dans le tableau V-3.

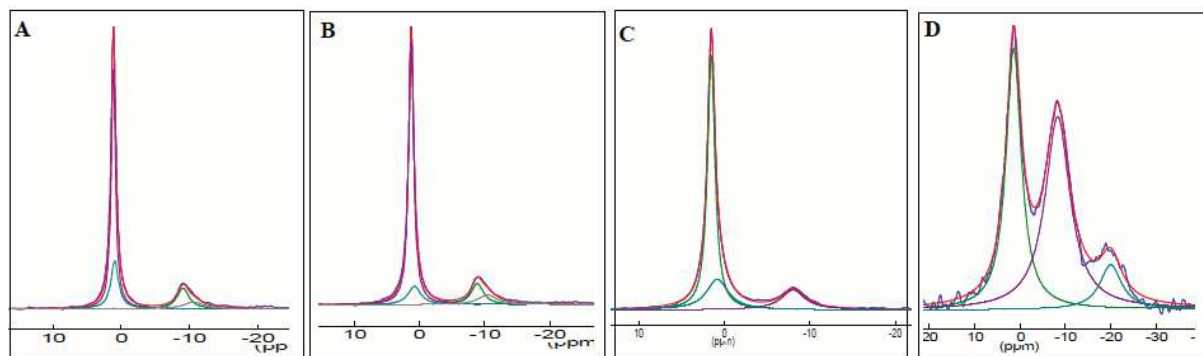


Figure V-5 : Décompositions des spectres de ^{31}P RMN de (A) 5%, (B) 7%, (C) 10% Pi-SiO₂ à Ta et (D) 10% Pi-SiO₂, 130°C.

Tableau V-3 : Quantification des spectres ^{31}P RMN 1pulse de 5, 7, 10% Pi-SiO₂ à Ta et 10% Pi-SiO₂ après 130°C/3h. δ en ppm et %age relatif en P par rapport au % total (%).

	5%Pi-SiO ₂		7%Pi-SiO ₂		10%Pi-SiO ₂		130°C-10%Pi-SiO ₂	
Q ⁰	1,15 ppm	58%	1,25 ppm	66%	1,5ppm	63%	1,45 ppm	41%
	0,95 ppm	21%	0,75 ppm	12%	0,8ppm	22%		
% Q ⁰ _{total}	79%		78%		85%		41%	
Q ¹	-9,0 ppm	14%	-8,9 ppm	13%	-8,0 ppm	15%	-8,2 ppm	49%
	-10,6 ppm	7%	-10,4ppm	9%				
% Q ¹ _{total}	21%		22%		15%		49%	
Q ²	-----		-----		-----		-19,2 ppm	10%
% Q ² _{total}	0%		0%		0%		10%	

On constate que le signal dans la région des Q⁰ renferme en fait deux environnements de monophosphates. Il est peu probable qu'il s'agisse d'états de protonation différents car *i*) ceux-ci devraient être suffisamment séparés pour ne pas échanger rapidement leurs protons, *ii*) dans ce cas, on s'attendrait à des différences de déplacement chimiques de 2 ou 3 ppm, alors que celles qui sont observées ici sont de 0,2 à 0,7 ppm seulement. On peut alors imaginer différents états d'interaction avec la surface (silanols de surface et/ou eau adsorbée). Une hypothèse plausible serait que le pic à 0,95 ppm corresponde à un complexe de surface impliquant un phosphate et une ou plusieurs molécules d'eau, puisqu'il disparaît lors d'une activation thermique plus prolongée.

La finesse du pic RMN indique une forte mobilité du composé. Dans une étude antérieure², il a été proposé qu'après séchage à température modérée, le phosphate se trouverait en solution solide supportée. Nous reviendrons sur cette hypothèse dans la discussion.

Les spectres RMN montrent aussi la présence de signaux larges dans la région de Q^1 , correspondant probablement à des pyrophosphates. On observe deux environnements différents de pyrophosphates pour les 5 et 7% Pi / SiO₂, à environ -9,0 et -10,4 ppm, tandis que pour le 10% Pi / SiO₂ on observe un seul environnement à -8,0 ppm.

Après activation thermique à 130°C de 10%Pi / SiO₂, les pics deviennent plus larges ce qui indique que les composés phosphatés sont peu mobiles suite à l'évaporation de l'eau physisorbée. D'après la décomposition de ce spectre, on trouve une diminution de moitié du % de monophosphate adsorbé accompagné d'une augmentation de presque 3 fois du % de Q^1 et d'une apparition d'un nouvel environnement de phosphate condensé à -19,2 ppm, caractéristique de phosphores Q^2 qu'on ne rencontre que dans les polyphosphates. L'activation thermique a donc induit la condensation des phosphates sur la surface de la silice.

La figure V-6 montre le spectre d'un échantillon de 5%Pi-SiO₂ chauffé sous vide à 160°C.

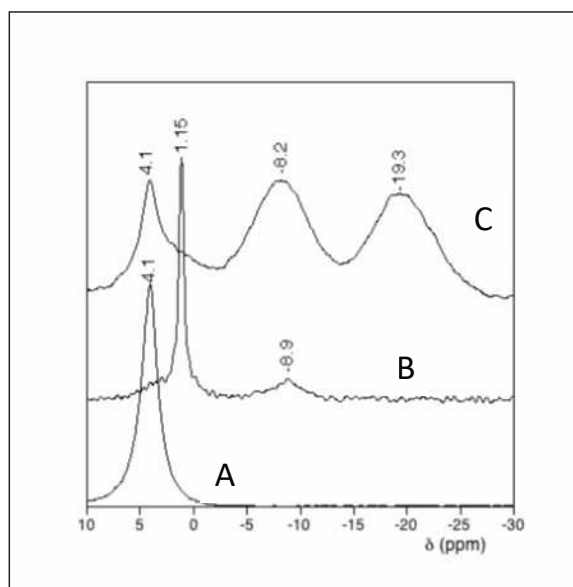


Figure V-6 : RMN du solide ³¹P, 1pulse de : KH₂PO₄ (A), 5%Pi / SiO₂ après séchage (B) et 5% Pi / SiO₂ après activation thermique à 160°C sous vide (C).

Après chauffage à 160°C sous vide, le spectre montre la présence de 3 pics : Q^0 (4,1 ppm, et un pic large vers 1 ppm), Q^1 (8,2 ppm) et Q^2 (-19.3 ppm). Ces pics sont larges, correspondant à des espèces peu mobiles. Qualitativement, le spectre est donc similaire à celui montré plus haut pour 10% Pi / SiO₂ activé à 130°C sous air. Le degré de polymérisation est plus avancé

puisque le total des phosphores contenus dans les polyphosphates représente 80% du total des phosphores présent dans l'échantillon. De plus, la résonance à 4,1 ppm est compatible avec la présence de KH_2PO_4 massique. La spéciation du phosphore est donc variable selon le mode d'activation thermique.

III.III RMN CP-MAS de ^{31}P , P_i/SiO_2

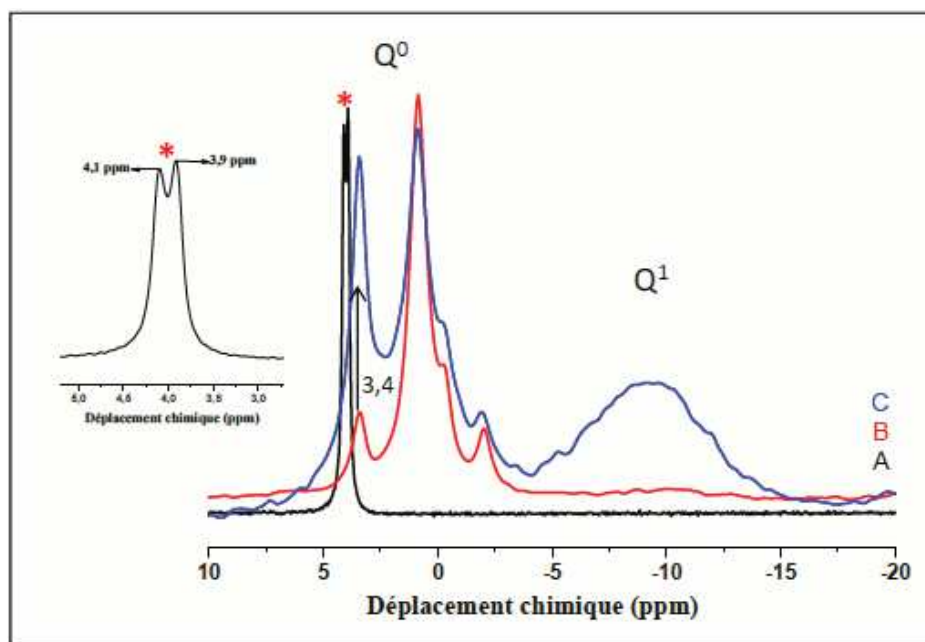


Figure V-7 : Spectre RMN CP $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ de KH_2PO_4 (A) ; 5% $\text{P}_i / \text{SiO}_2$, après séchage (B) et activation à 130°C (C)

Après séchage, l'échantillon présente différents environnements de Q^0 (monophosphates) (B). Par rapport aux spectres 1-pulse, les spectres CP-MAS montrent deux nouveaux environnements de phosphates correspondant à des pics fins, d'intensité assez faible, à des déplacements chimiques négatifs. De plus, un autre pic faible apparaît à 3,4 ppm : il pourrait s'agir d'une faible quantité de KH_2PO_4 précipité, dont le signal serait exalté par les conditions CP. Un pic large est sans doute présent dans la région des Q^1 . Son intensité relative est nettement plus faible que sur le spectre 1-pulse, ce qui pourrait s'expliquer si le diphosphate correspondant est complètement déprotonné.

L'activation thermique de cet échantillon provoque peu de changement au niveau de la région Q^0 du spectre (C), on observe les mêmes environnements. Cependant, cette activation se traduit par la présence d'un pic nettement plus intense dans la région de Q^1 . Cela est compatible avec l'évolution en 1-pulse ; par contre dans la région de Q^2 , on n'observe aucun

pic en CP. Ici aussi, la spéciation acido-basique, qui détermine l'état de protonation des espèces, joue certainement un rôle prédominant.

III.IV RMN 2D (^{31}P , ^1H)

L'analyse RMN 2D $^{31}\text{P}/^1\text{H}$, a été effectuée sur deux échantillons : 10% Pi-SiO₂-Ta et 5%Pi-SiO₂-160°C (chauffé sous vide). Les spectres obtenus sont présentés dans la figure V-8.

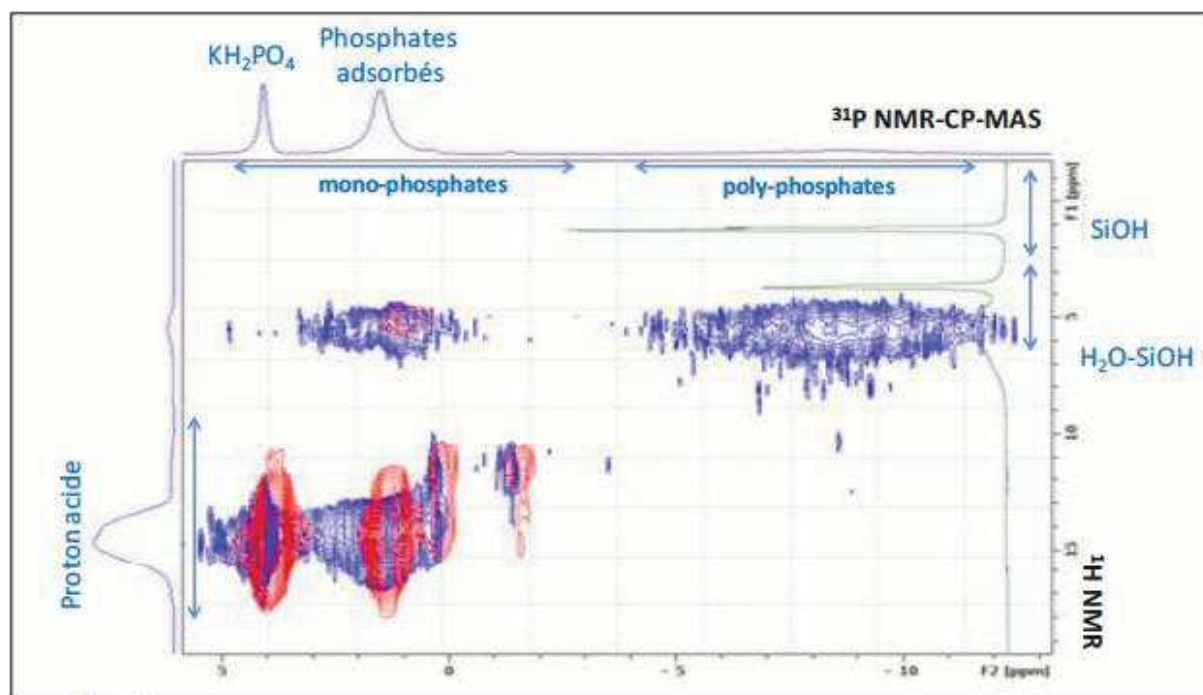


Figure V-8 : RMN HETCOR ^1H - ^{31}P . En rouge, échantillon de Pi / SiO₂ séché à 70°C. En bleu, échantillon de Pi / SiO₂ chauffé à 160°C. Axe vertical gauche: projection sur la dimension ^1H avant chauffage. Axe vertical droit : projection sur la dimension ^1H après chauffage.

Les taches de corrélation rouges se rapportant à l'échantillon séché à 70°C montrent la présence d'autres pics de monophosphates (Q^0) que ceux détectés en analyse RMN 1-pulse. Ces pics apparaissent à 0, -2,0 et 4,2 ppm, à des positions proches de celles qui sont observées en CP-MAS. Tout comme le pic centré à 1,5 ppm, ils semblaient corrélés avec des protons acides des phosphates (entre 10 et 15 ppm). Le pic à 4,2 ppm est attribué aux phosphates massiques, étant donné que cette observation est en corrélation avec les pics de diffraction du phosphate massique observés avec l'un des échantillons de 10%Pi-SiO₂ (Figure.2B). Les autres pics doivent correspondre à des monophosphates adsorbés. Seul le pic à 1,5 ppm montre une corrélation avec les protons de silanols dit associés ($\delta = 5$ ppm), c'est-à-dire en échange rapide avec l'eau ou avec les protons des silanols vicinaux.

En ce qui concerne l'état de protonation des phosphates chauffés, les résultats de RMN 2D montrent des taches de corrélation très étendues (taches bleues). Néanmoins, les zones sont similaires : les phosphates Q^0 sont bien corrélés aux protons acides vers 15ppm mais aussi à un site particulier de silanol associé. Les phosphates Q^1 sont eux corrélés à exclusivement un site de silanols associés, celui vers 5ppm.

IV. Discussion générale sur les systèmes Pi/SiO₂

IV.I Adsorption de Pi sur silice : recouvrement de saturation et précipitation

Les données DRX obtenues sur nos échantillons de base semblent montrer que, jusqu'à 10 % Pi/SiO₂ (inclusivement), il n'y a pas de phosphates massiques précipités, donc que tous les phosphates sont adsorbés (en interaction avec la surface ; cf § C.II). Toutefois, une étude antérieure dans notre équipe suggérait que la limite d'adsorption en surface de silice se trouvait un peu plus bas (vers 8% en masse) ; d'autre part, des études de reproductibilité des échantillons nous ont parfois montré la présence de précipités dès 10% en masse. Il y a donc une incertitude quant à la valeur précise du recouvrement de saturation des espèces adsorbées en surface de silice, et des études plus précises seraient nécessaires avec un contrôle très précis des paramètres de préparation (notamment des conditions de séchage). Notons, pour terminer, que la RMN 1-pulse de ³¹P, pour la série d'échantillons étudiée dans cette thèse, est en accord avec la DRX : il n'y a pas de précipités de phosphates massiques jusqu'à une charge 10% en masse inclusivement.

IV.II Spéciation du Pi adsorbé

Il a été proposé précédemment², sur base de la finesse des signaux RMN, qu'après séchage le phosphate se trouverait en solution aqueuse supportée à la surface de la silice. Pour évaluer cette hypothèse, il est utile de comparer les quantités d'eau et de phosphate présentes dans les échantillons. A partir des études ATG /ATD (Tableau 1), nous avons évalué les quantités d'eau à environ 2,6 à 4,9 % par masse de silice, ce qui correspond à des rapports allant de 3,2 jusqu'à 12,3 moles d'eau/phosphate. De telles quantités d'eau adsorbées paraissent très faibles pour envisager une véritable "solution supportée", où les concentrations en phosphate atteindraient des valeurs invraisemblablement élevées.

A cet égard, il est intéressant de noter la présence des pyrophosphates dès la température de séchage (70°C), montrée par la RMN du phosphore. Connaissant l'enthalpie libre de formation du pyrophosphate dans l'eau, on peut estimer la constante d'équilibre de la réaction de dimérisation²; même dans les conditions de concentrations globales en phosphates

extrêmement élevées qu'on déduirait du Tableau 1, le taux de dimérisation devrait être très faible. On peut en conclure que les données thermodynamiques afférentes aux espèces en solution ne peuvent pas être utilisées pour des espèces adsorbées, et donc que l'interaction avec les groupes de surface favorise les dimères (pyrophosphates) par rapport aux monomères (monophosphates).

Cette conclusion est confortée si l'on considère les pourcentages relatifs de monophosphate et de diphosphate en fonction de la charge totale. S'ils étaient dictés par une réaction de dimérisation dans une solution, supportée ou non, la fraction de dimères devrait augmenter avec la charge totale en phosphates. Or, c'est l'inverse qu'on observe : le pourcentage de monomères augmente légèrement avec la charge, passant de 78% du total pour une charge de 5% ou 7% Pi-SiO₂ à 84% pour une charge de 10%Pi-SiO₂.

En revanche, des espèces de phosphates adsorbés (donc interagissant avec des groupes de surface de la silice) mais présentant une mobilité significative peuvent être envisagées. Une situation très semblable a été mise en évidence dans l'adsorption de glycine sur silices mésoporeuses, où la molécule adsorbée se réoriente rapidement tout en maintenant une liaison hydrogène avec la surface de la silice³, celle-ci agissant comme une rotule autour de laquelle une rotation est possible.

La décomposition des signaux RMN semble même montrer l'existence de deux formes adsorbées légèrement différentes, et qui ne sont pas en échange rapide, tant pour les monophosphates que pour les diphosphates. Les expériences CP-MAS et RMN 2-D indiquent même d'autres formes adsorbées, nettement minoritaires mais exaltées par le transfert de polarisation.

IV.III Condensation des phosphates sous activation thermique

En RMN, nos données sont limitées puisque nous disposons de résultats sur l'activation thermique sous flux d'air à 130°C pour 10% Pi/SiO₂, et sous vide pour 5% Pi/SiO₂. Il est clair néanmoins que l'activation thermique cause dans les deux cas une perte de mobilité, et surtout une condensation des monophosphates en pyrophosphates et polyphosphates.

Les données de thermogravimétrie, obtenues sous flux d'air, montrent deux types d'évènements thermiques. Les évènements à haute température observés pour les faibles charges en phosphates sont, nous l'avons dit, difficilement compatibles avec des condensations de groupes phosphates. Peut-être s'agit-il d'une condensation de silanols de

surface influencée par les espèces adsorbées ; cette question mériterait une étude plus approfondie.

Les évènements à température moyenne par contre, généralement matérialisés par un ou deux pics fins en DTG, sont bien corrélés à la charge en Pi, comme le montre la Figure V-9.

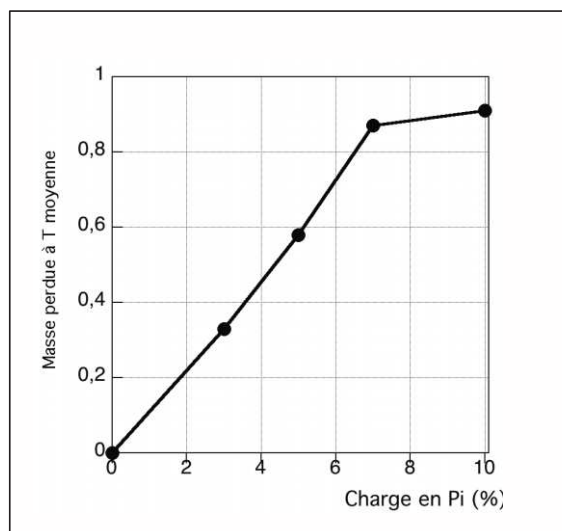


Figure V-9 : corrélation de la masse perdue à température moyenne avec la charge en Pi.

Jusque 7% Pi / SiO₂, les pertes de masse à températures moyenne sont linéairement corrélées à la charge en phosphate et correspondent à une perte de 16 unités de masse par anion phosphate. Si nous définissons la "condensation complète" comme la formation de deux liaisons P-O-P à partir des P-O-H pour chaque unité phosphate (donc perte d'une molécule d'eau, soit 18 unités de masse, par anion phosphate), nous avons pour ces évènements à température moyenne un taux de condensation de 89%.

L'échantillon 10% Pi / SiO₂ quant à lui montre en TG un taux de condensation plus faible, de 69%. Tout se passe comme si, jusque 7% en Pi, la silice était capable de catalyser une condensation quasi complète des ions phosphates (taux de condensation proches de 100%); mais entre 7% et 10%, les ions phosphates supplémentaires sont très peu condensés. Il est possible que la surface de silice contienne un nombre limité de sites catalytiques capables de déclencher la condensation des phosphates vers 190°C, et qu'ils soient saturés entre 7 et 10%. Quoi qu'il en soit, pour les échantillons à plus faible teneur en Pi, les taux de condensation élevés calculés à partir des TG s'expliquent le plus logiquement par la formation de trimétophosphates cycliques, ce qui est intéressant car ces espèces sont connues comme agents de phosphorylation efficaces.

Dans le cas de 10% Pi / SiO₂, on peut comparer la TG aux données RMN (Tableau V-3) : après activation à 130°C, ce même échantillon montre par RMN 49% de Q¹ (chacun correspondant à une liaison P-O-P, soit une perte de 1/2 H₂O par groupe phosphate) et 10% de Q² (chacun correspondant à deux liaisons P-O-P, soit une perte de 1 H₂O par groupe phosphate) : soit un taux de condensation de $0,49 \cdot 0,5 + 0,10 \cdot 1 = 0,35$ ou 35%. La condensation évaluée de cette façon est moins avancée ; mais les conditions d'activation, à 130°C, ne permettent probablement pas de réaliser quantitativement une transformation qui n'est observée qu'à 190°C sous rampe TG. Les données obtenues pour l'échantillon activé à 160°C sous vide vont dans ce sens puisqu'elles montrent une condensation plus poussée.

On peut se demander d'autre part à quoi correspondent les deux événements de condensation observés séparément en TG pour certains échantillons ? A la condensation de deux types différents de monophosphates adsorbés, peut-être ceux qui sont observés en RMN de ³¹P à 0,75-0,95 et 1,15-1,50 ppm respectivement ? L'idée est tentante, mais pas certaine. En effet, l'échantillon à 5% Pi montre déjà deux espèces adsorbées différentes par RMN, mais ne montre pas deux événements en TG.

IV.IV Discussion générale et signification prébiotique

D'un point de vue purement pratique, l'adsorption sur silice permet de condenser les monophosphates en diphosphates et polyphosphates : avec un degré de condensation limité (environ 20%) après séchage à température modérée (70°C), et plus élevé lors d'activations thermiques un peu plus sévères tout en restant raisonnables: la TG suggère même qu'on pourrait arriver à une transformation presque quantitative en polymétaphosphates (nous favorisons des trimétaphosphates parce qu'il nous semble que la condensation d'un nombre plus élevé de monomères est peu plausible, mais cela reste à confirmer). Cela signifie que l'activation thermique de phosphates inorganiques déposés sur silice transforme ces molécules en réservoirs d'enthalpie libre, sources potentielles d'énergie libre pour les réactions prébiotiques⁴.

L'adsorption semble modifier la thermodynamique de condensation des phosphates puisque nous observons des diphosphates dans des conditions où le degré d'hydratation est encore relativement élevé, et où ceux-ci devraient être encore thermodynamiquement défavorisés. Un séchage plus complet, en diminuant fortement l'activité de l'eau, rend comme prévu thermodynamiquement favorable la condensation en polyphosphates. On se rend compte alors que la surface de silice a visiblement aussi un effet catalytique (cinétique) sur la réaction de

condensation des phosphates adsorbés, qui est rapide dès 190°C alors que, dans le KH_2PO_4 massique par exemple, elle n'est terminée que vers 400°C.

Cet effet doublement favorable (thermodynamiquement et cinétiquement) de la surface de silice sur la condensation des phosphates nous guidera pour l'étude d'autres réactions de condensation.

B. Phosphorylation du ribose sur la surface de la silice

Après avoir étudié la réactivité thermique du ribose (chapitre II) et la formation des polyphosphates sur la surface de la silice, le moment est venu d'étudier les possibilités de réaction entre les deux partenaires, le ribose et le phosphate, sur la surface de la silice. Dans cette partie nous avons préparé les échantillons de deux façons différentes : Co-adsorption (ou adsorption simultanée) et adsorption en deux étapes, et nous avons procédé aux mêmes types d'analyse qui ont été décrits précédemment.

I. Adsorption simultanée de ribose et KH_2PO_4

Des échantillons ont été préparés par IHN avec deux charges massiques différentes de ribose (3 et 5% par rapport à la masse de silice) et deux rapports molaires phosphate/ribose différents (1 et 2 équivalents molaire par rapport à la quantité de ribose introduite). Les échantillons ainsi préparés ont été analysés à T_a et à 130°C. Ils seront notés de cette façon $y\% \text{ RXP} / \text{SiO}_2$, T_a ou 130°C, où y note la charge massique en ribose (%) et x : le nombre d'équivalents molaires de phosphate par rapport au ribose.

1.1 Diffraction des rayons X (DRX)

Comme indiqué précédemment, la diffraction de rayons X permet de préciser si l'échantillon contient du phosphate dans une phase cristalline après adsorption ou si la totalité du phosphate est adsorbée sur la surface de la silice. Tous les échantillons préparés ont été analysés par DRX. Les diffractogrammes obtenus sont présentés dans la figure V-10 pour les séries 3% $\text{RXP} / \text{SiO}_2$ (A) et 5% $\text{RXP} / \text{SiO}_2$ (B).

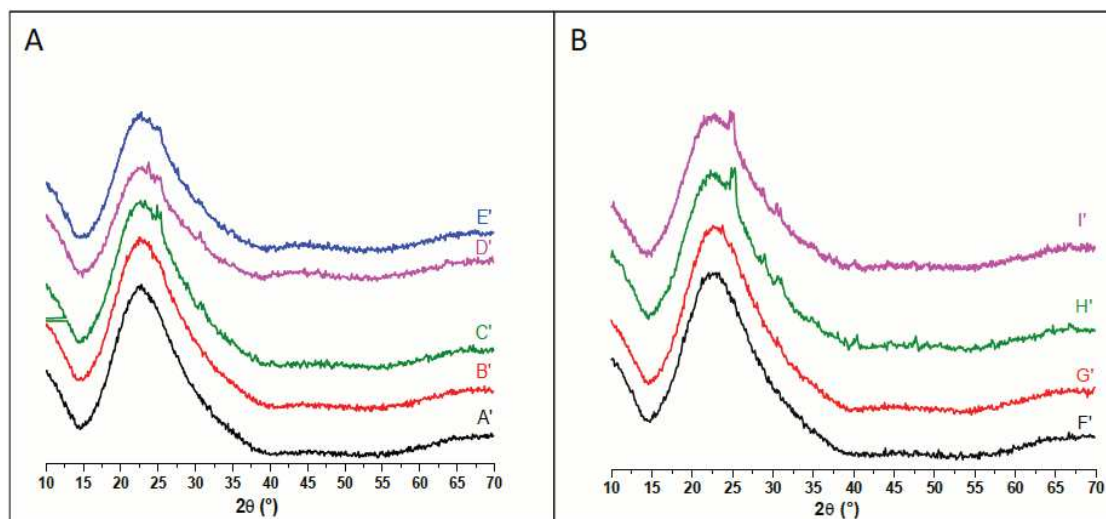


Figure V-10 : Diffractogrammes de 3% RxP / SiO₂ (A) et 5% RxP / SiO₂ (B).
A': x=1, Ta; B': x=1, 130°C; C': x=2, Ta; D': x=2, 130°C; E': x=2, 130°C + HS;
F': x=1, Ta; G': x=1,130°C; H': x=2,Ta; I': x=2, 130°C.

Certains échantillons montrent les pics caractéristiques de KH₂PO₄ cristallin à 25,1, 31,0, 28,9, 23,7 et 25,1° 2θ. Ils sont apparents pour 3% R2P / SiO₂, qui contient 5,4% massiques de KH₂PO₄, et surtout pour 5% R2P / SiO₂ (9,1 % massiques de KH₂PO₄); probables mais très faibles pour 5% R1P / SiO₂, du moins après chauffage (4,5 % massiques de KH₂PO₄). Le recouvrement de saturation, au-delà duquel KH₂PO₄ précipite, serait donc compris entre 4,5% et 5,4%, soit significativement plus bas qu'en l'absence de ribose. Toutefois, on a vu plus haut (§C. II) que ce recouvrement de saturation peut varier assez nettement selon les conditions de préparation.

D'autre part, on remarque une diminution de l'intensité des pics de KH₂PO₄ lorsque l'échantillon est soumis à un cycle humidification-séchage (HS ; comparer D'et E'). Ce résultat indique que le phosphate massique précipité peut être resolubilisé et adsorbé sur la surface de la silice : la présence d'un précipité massique peut alors correspondre à un état métastable.

I.II Analyse thermogravimétrique (ATG)

La figure V-11 présente les courbes DTG des échantillons de 3% R2P / SiO₂, 3% R 1,5P / SiO₂ et ceux des références de silice, ribose massique, 10%Ribose / SiO₂ et 10%Pi / SiO₂.

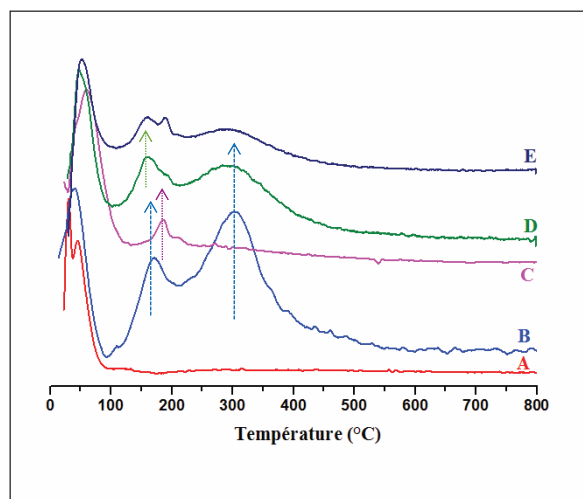


Figure V-11 : DTG de la silice amorphe (A), 5% Ribose / SiO₂ (B), 5%Pi / SiO₂ (C), 5% R1P / SiO₂ (D), 5%R 1,5P / SiO₂ (E).

Les thermogrammes des échantillons Ribose + Pi / SiO₂ ressemblent à première vue à une superposition de ceux du Ribose/SiO₂ d'une part, et de Pi/SiO₂ d'autre part (comparer p.ex. la courbe E, pour un échantillon contenant les deux composantes, avec les courbes B et C). Cependant, un examen plus attentif montre des différences : certains pics sont significativement déplacés par rapport à leur position dans les références. Plus précisément, le premier pic apparaît à 160°C, avec un déplacement de -12°C par rapport à celui du Ribose/SiO₂. Le deuxième pic apparaît à 190°C, soit +5°C par rapport à celui de Pi / SiO₂, ce qui est moins significatif. Ce pic est plus faible pour 5%R1P / SiO₂ que pour 5% Pi / SiO₂, alors que la charge en phosphate est comparable (4,5% au lieu de 5%). Il semble donc qu'une partie des phosphates ne réagissent plus par polymérisation (événement à 185-190°C) lorsque du ribose est également présent sur la surface ; comme le ribose lui-même donne des signes de transformation à température plus basse, il est plausible que ces phosphates réagissent avec les riboses au lieu de réagir entre eux.

Le tableau V-4 présente les % de perte massique, corrigés pour les pertes de la silice hydratée.

Tableau V-4 : % de perte massique des pics observés dans les DTG, corrigés par rapport aux pertes de masse de la silice

Echantillon	% de perte massique		
	pic 1	pic 2	pic 3
5% Ribose / SiO ₂	1,1	-----	3,8
5% Pi / SiO ₂	-----	0,58	-----
5%R1P / SiO ₂	1,22	0,44	3,2
5%R 1,5P / SiO ₂	1,39	0,59	3,51

Globalement, la somme des "pic 1" et "pic 3" correspond à 4,9%, soit l'élimination totale du ribose, pour l'échantillon de base sans phosphate et celui contenant 1,5 équivalents molaires de Pi, et un peu moins (4,42%) pour l'échantillon contenant 1 équivalent molaire de Pi. Il est donc logique de les attribuer à des réactions impliquant le ribose.

Le pic 1 correspond à la perte de masse de deux molécules d'eau par, et au Chapitre 2 nous l'avons attribué à des réactions de déshydratation du ribose sans condensation. Cette perte augmente quelque peu en augmentant la quantité de phosphate introduite, en même temps que le T_{\max} se déplace vers de plus basses températures. On peut penser que des réactions de condensation ont lieu entre le ribose et les phosphates, en concurrence avec les réactions de déshydratation.

Le deuxième pic correspondrait à des réactions impliquant les phosphates uniquement. Les quantifications données pour ce pic dans le tableau sont certainement surestimées car elles ne tiennent pas compte du recouvrement avec le pic 1. Néanmoins, on voit que la quantité d'eau formée par phosphate est plus faible que dans l'échantillon de référence sans ribose. Cela est compatible avec un scénario où une partie des phosphates ont réagi avec le ribose, laissant moins de phosphates susceptibles de se condenser entre eux.

I.III Spectrométrie infrarouge (FTIR)

Les spectres IR sont uniquement exploitables dans la région comprise entre 1900 et 1350 cm^{-1} . En-dessous de 1350 cm^{-1} environ, les bandes de vibration de la silice sont prédominantes et empêchent l'observation de celles des molécules supportées. Ceci inclut malheureusement les bandes de vibration caractéristique du ribose-phosphate à 869, 815 et 777 cm^{-1} .⁵ Cependant, et comme pour le Ribose / SiO₂ (Chapitre 2), des informations pourront être obtenues sur la réactivité thermique du ribose adsorbé dans différentes conditions, ce qui permet de déterminer la température maximale d'activation. Les résultats du chapitre III nous ont conduits à choisir une température de 130°C pour l'activation des échantillons, car au-delà le ribose peut subir des transformations profondes.

I.IV RMN

i. RMN de ³¹P, 1-pulse

La figure V-12 présente la série 3% ribose + Pi / SiO₂ et la figure V-13 celle de 5% ribose + Pi / SiO₂. Parmi les spectres de référence, " Rib5'P" désigne le ribose-5'-phosphate massique, une molécule qui pourrait se former par phosphorylation du ribose.

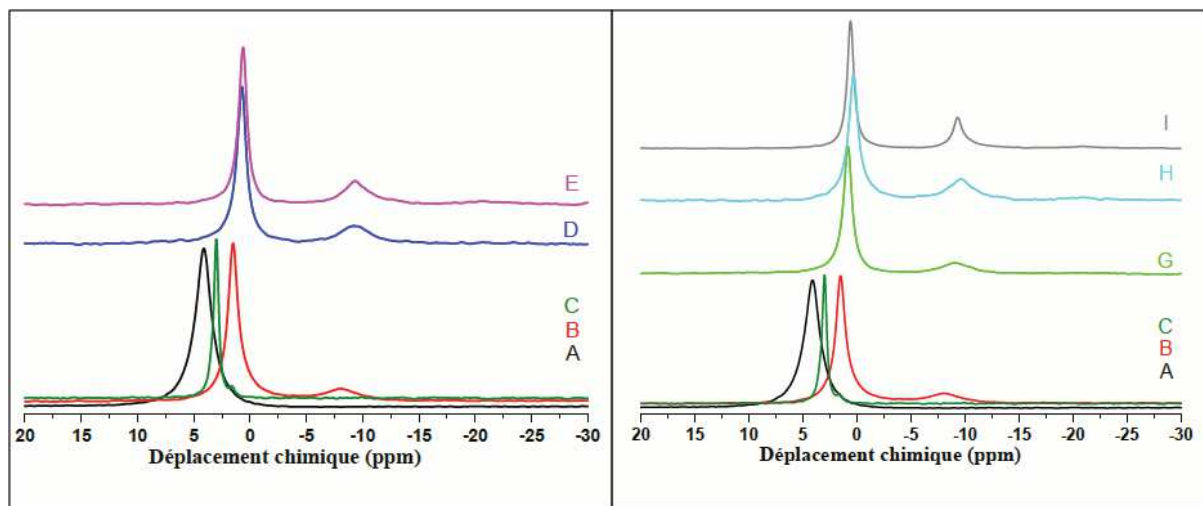


Figure V-12 : ^{31}P RMN, 1 pulse de KH_2PO_4 (A), 10% Pi / SiO_2 (B), Rib5'P (C), 3% R1P / SiO_2 après séchage (D) et activation à 130°C (E), et 3% R2P / SiO_2 après séchage (G), activation à 130°C (H), et $130^\circ\text{C} + \text{hydratation-séchage}$ (I).

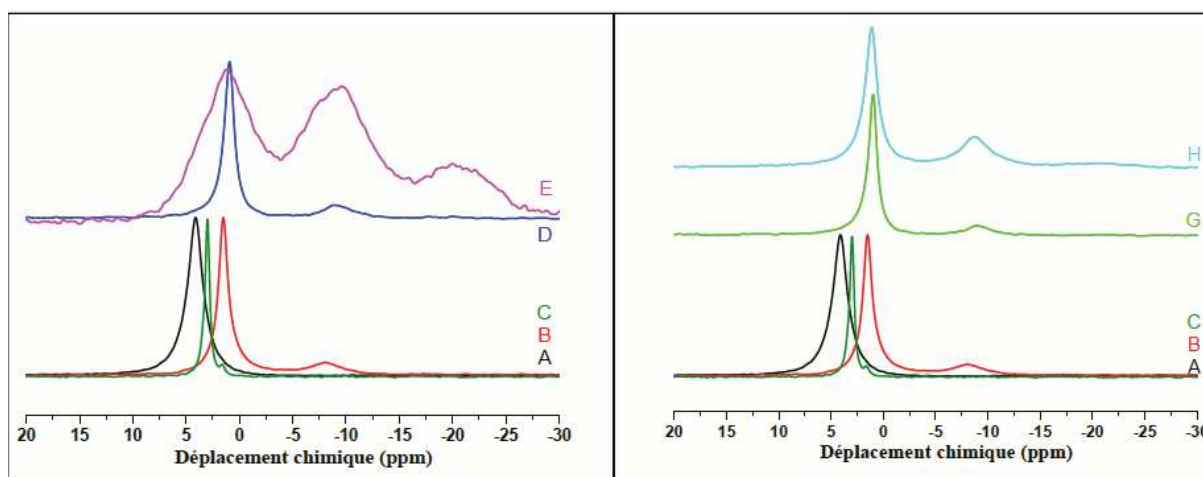


Figure V-13 : ^{31}P RMN, 1 pulse de KH_2PO_4 (A), 10% Pi / SiO_2 (B), Rib5'P (C), 5% R1P / SiO_2 après séchage (D) et activation à 130°C (E) et 5% R2P / SiO_2 après séchage (G) et activation à 130°C (H).

Comme présenté dans la partie B, le phosphate massique (KH_2PO_4) présente un signal dans la région Q^0 à + 4,1 ppm, tandis que le phosphate supporté sur silice renferme deux environnements dans cette région correspondant à des monophosphates adsorbés (1,5 et 0,9 ppm). La référence du ribose phosphorylé en position 5' présente un pic principal à + 2,9 ppm, et un pic plus petit qui doit correspondre à une impureté. Ceci nous indique qu'un environnement du phosphore contenant une liaison ester phosphorique P-O-C (qu'on peut noter Q^0 (1C)) donne un signal dans la région des monophosphates, mais qui ne coïncide ni avec le phosphate massique, ni avec le phosphate supporté.

Les spectres des échantillons (ribose + phosphate) supportés montrent initialement une spéciation du phosphore similaire à celle observée en l'absence de ribose, avec une majorité de Q^0 et une minorité de Q^1 . Par rapport aux échantillons contenant uniquement du phosphate où l'activation à 130°C causait une polymérisation significative, la présence du ribose semble inhiber cette polymérisation. Pour 3% RxP / SiO_2 , elle n'est pas apparente, quel que soit le rapport molaire Pi : ribose ($x = 1$ ou 2). Dans le cas des échantillons à 5% ribose, la conclusion est différente selon le rapport massique : pour 5% R1P / SiO_2 , l'activation à 130°C cause un élargissement des pics, l'augmentation de la quantité relative de Q^1 et l'apparition d'un environnement Q^2 , comme pour les phosphates adsorbés sans ribose, mais pour 5% R2P / SiO_2 , ces modifications ne semblent pas apparaître.

Pour aller plus loin dans l'analyse, on a décomposé tous ces spectres. La figure V-14 présente les décompositions des échantillons 3% RxP / SiO_2 . Pour les deux rapports massiques Pi : ribose, $x = 1$ et $x = 2$, on observe la présence de trois environnements de Q^0 et deux environnements de Q^1 , contre deux et un respectivement dans l'échantillon de référence Pi / SiO_2 . Les décompositions montrent donc l'apparition de deux nouveaux environnements du phosphore lorsque le phosphate coexiste avec du ribose : ils sont signalés par des étoiles rouges sur les spectres. Le Tableau V-5 résume les positions de ces "composantes supplémentaires" et leurs intensités relatives.

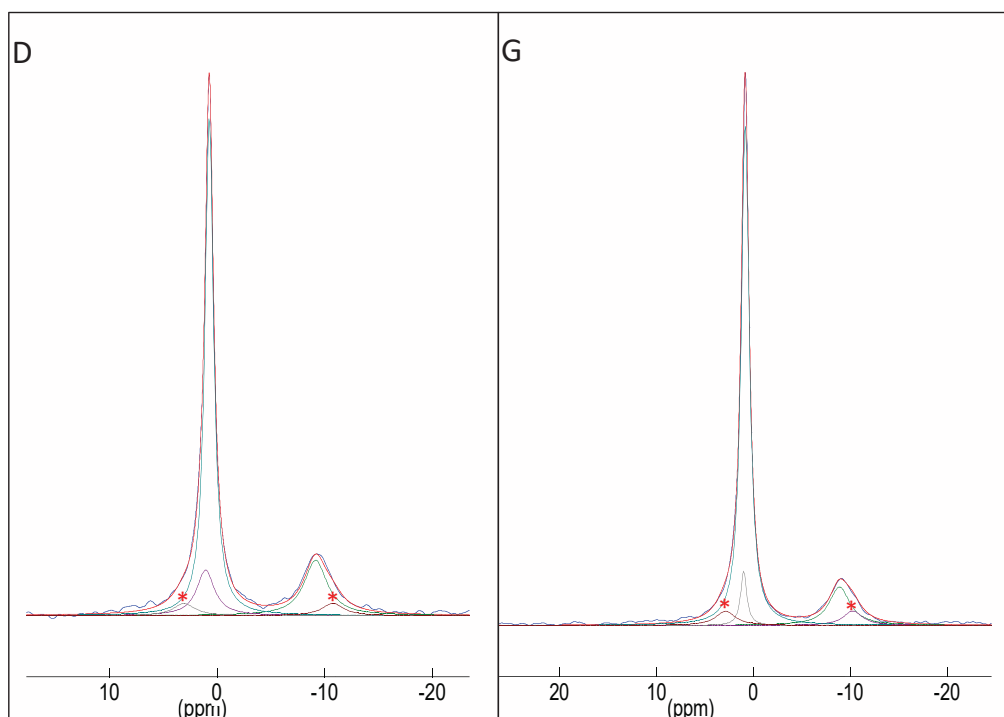


Figure V-14 : les décompositions des spectres de RMN de ^{31}P de (D) 3% R1P / SiO_2 , 70°C , et (G) 3% R2P / SiO_2 , 70°C .

Tableau V-5 : position et contribution relative des "composantes supplémentaires" dans les échantillons 3% RxP / SiO₂

Ta	Déplacement chimique (ppm)	% par rapport au phosphore total	Largeur à mi-hauteur (ppm)
3% R1P / SiO ₂	+ 3,0	3,82	2.40
	-10,7	3,85	2.41
3% R2P/ SiO ₂	+ 2,9	4,95	2.47
	-10,2	4,86	2.37

Les composantes supplémentaires apparaissent vers +3,0 et -10,4 ppm (valeurs moyennes). La première coïncide avec le signal de la référence de rib5'P massique (+2,9 ppm). Ceci peut constituer un indice de phosphorylation du ribose.

La seconde composante, qui apparaît dans la région des Q¹, représente le même pourcentage du total des phosphores que la composante à 2,9 ppm (les largeurs de ces deux signaux sont aussi semblables). Ces deux pics pourraient donc être dus à une seule et même molécule contenant deux environnements distincts du phosphore, et nous suggérerons dans la discussion qu'il peut s'agir de PRPP (PhosphoRibosylPyroPhosphate).

La figure V-15 et le Tableau V-6 présentent les résultats relatifs aux échantillons 5% RxP / SiO₂.

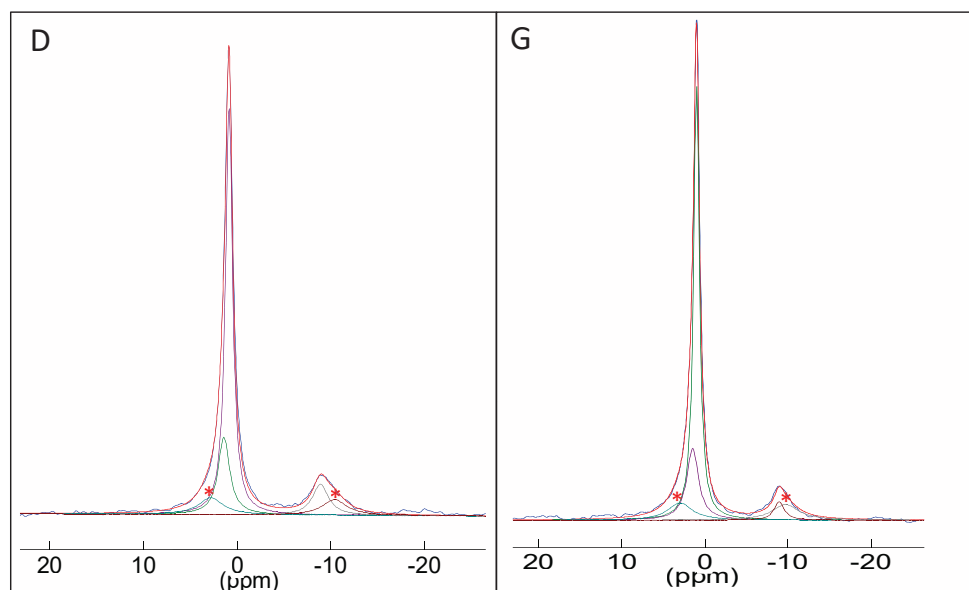


Figure V-15 : Décompositions des spectres de ³¹P RMN de (D) 5%R1P / SiO₂, après séchage et (G) 5%R2P / SiO₂, après séchage.

Tableau V-6 : position et contribution relative des "composantes supplémentaires" dans les échantillons 5% R_xP / SiO₂

Ta	Déplacement chimique (ppm)	% / phosphore total	Largeur à mi-hauteur (ppm)
5% R1P / SiO ₂	2,85	8,2	3,15
	-10,3	7,6	3,15
5% R2P / SiO ₂	3,0	9,54	3,52
	-9,7	9,53	3,89

Dans cette série également, on observe l'apparition de deux nouveaux environnements de phosphate dans la région de Q⁰ et celle de Q¹. Les deux nouveaux pics apparaissent à la même position que ceux observés dans la série de 3%, mais sont significativement plus larges (surtout pour un rapport Pi : ribose de x = 2). Comme dans la série précédente, les deux pics sont équivalents en terme de % relatif en phosphore et de mobilité : ils représentent environ 7,9% du phosphore total pour (Pi : ribose) = 1, et 9,5 % du phosphore total pour (Pi : ribose) = 2. L'augmentation n'est pas proportionnelle, mais va dans le sens attendu pour une réaction de condensation.

Pour mieux pouvoir comparer les deux séries (3% et 5% de ribose), on a rassemblé toutes les données obtenues au tableau V-7.

Tableau V-7 : résumé des données de décomposition des spectres RMN de ³¹P des 3% ribose + Pi / SiO₂ et +2+<QA5% ribose + Pi / SiO₂

Ta	Série à 3% de ribose		Série à 5% de ribose		Pi / SiO ₂
	1 équ. molaire de Pi	2 équ. molaire de Pi	1 équ. molaire de Pi	2 équ. molaire de Pi	5% Pi
% Q ⁰ total	78	81	83	86	79
% Q ¹ total	22,5	19	17,5	14	21
% Q ² total	----	----	----	----	----
% de « PRPP »	3,8	4,9	7,9	9,5	----

Les figures V-16 et V-17 présentent les décompositions des spectres RMN ^{31}P des séries à 3 et 5 % ribose, respectivement, après activation thermique à 130°C.

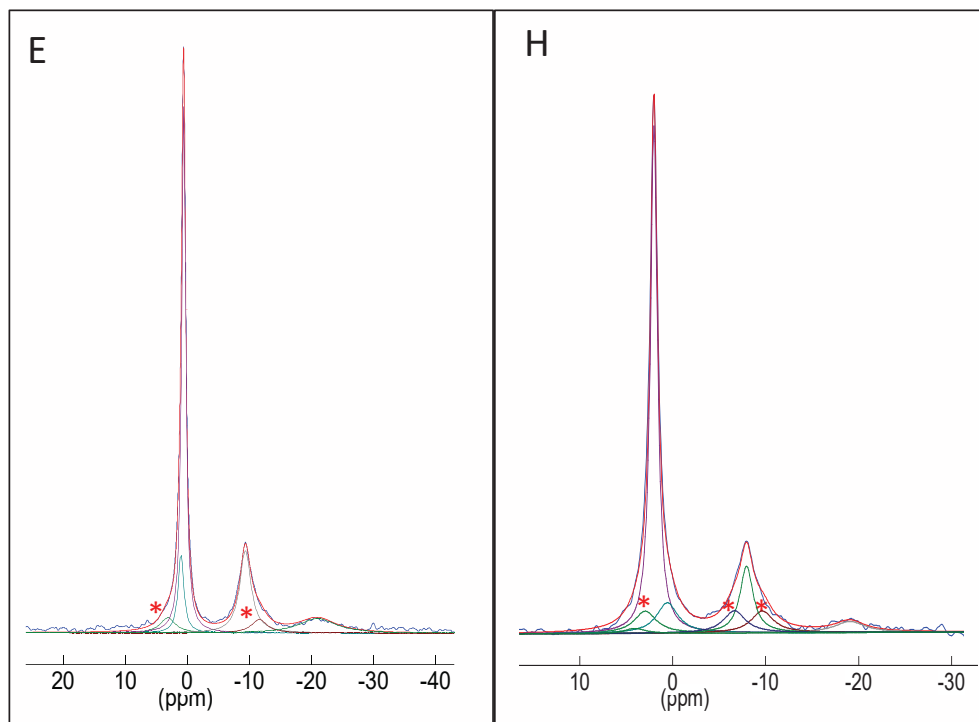


Figure V-16 : Décompositions des spectres RMN de ^{31}P de (A') 3% R1P / SiO₂, 130°C et (B') 3% R2P / SiO₂, 130°C.

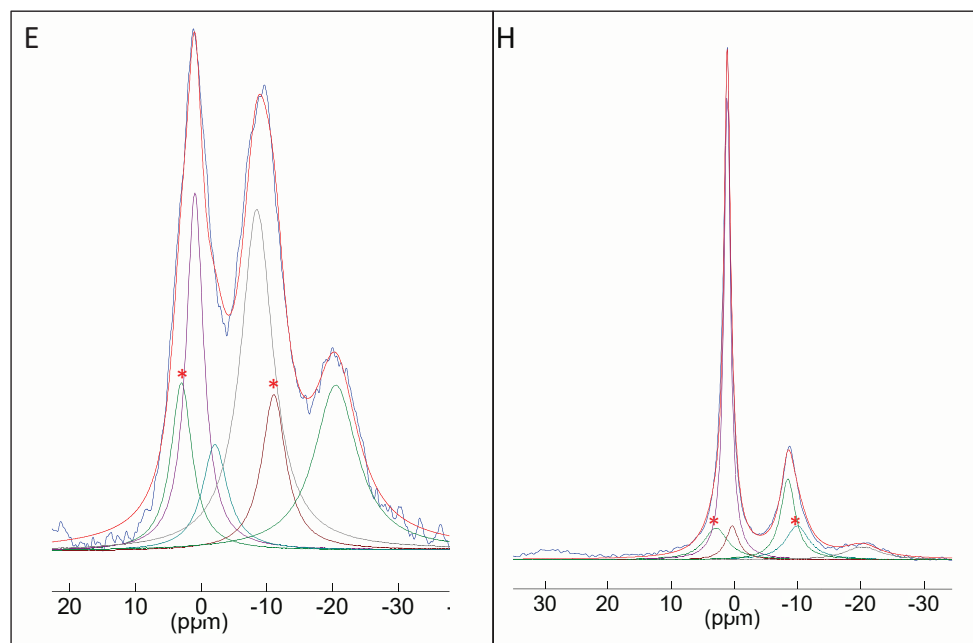


Figure V-17 : Décompositions des spectres de ^{31}P RMN de (E) 5% R1P / SiO₂, 130°C et (H) 5% R2P / SiO₂, 130°C.

Tableau V-8 : Décomposition des spectres RMN de ^{31}P des 3% R_xP / SiO₂ et 5% R_xP / SiO₂, après activation à 130°C ; contributions des composantes attribuées au PRPP.

130°C	Déplacement chimique (ppm)	% en phosphore/% total	Largeur à mi-hauteur (ppm)
3% R1P / SiO ₂ , 130°C	+3,2	5,15	2,97
	-11,5	4,9	3,10
3% R2P / SiO ₂ , 130°C	+2,9	7,0	2,87
	-6,35	7,1	3,44
	-9,5	6,8	2,92
5% R1P / SiO ₂ , 130°C	+3,0	9,6	4,08
	-10,6	9,4	4,00
5%R2P / SiO ₂ , 130°C	+2,9	11,5	4,63
	-10,0	11,5	4,45

Après chauffage à 130°C, les échantillons à faible teneur en ribose (série 3% R_xP / SiO₂) sont très peu affectés par rapport aux mêmes échantillons séchés à 70°C. Les trois environnements de Q⁰ et les deux environnements de Q¹ observés avant chauffage sont toujours présents; la similitude des décompositions entre ces échantillons différents est d'ailleurs un argument pour leur validité. Notamment, les deux composantes vers +2,9 à +3,3, et à -9,5 à -11,5 ppm, que nous avons attribuées au PRPP, sont toujours présentes et leurs intensités sont toujours à peu près égales. Leur contribution a toutefois augmenté, de manière sans doute significative (de 3,8% à 5,0% pour Pi: ribose = 1, de 4,9% à 7,0% pour Pi: ribose = 2; et leur largeur à mi-hauteur a augmenté, ce qui pourrait indiquer une diminution de mobilité. A noter également que l'on n'observe pas l'apparition d'environnements Q², et donc pas de condensation des monophosphates entre eux pour donner des polymétaphosphates - cela n'était pas forcément attendu pour les charges en Pi assez faibles de ces échantillons, 5,4% au maximum.

Pour les échantillons à teneur en ribose plus élevée (série 5% ribose + Pi / SiO₂), nous avons obtenu des spectres très différents entre les rapports Pi: ribose = 1 et 2. L'échantillon 5% R2P / SiO₂ 130°C est assez similaire à son correspondant à 3% de ribose, avec la différence qu'une quantité mineure de polymétaphosphates s'est formée au chauffage (pic Q² à -20 ppm). Mais l'échantillon 5% R1P / SiO₂ 130°C montre des pics beaucoup plus larges, correspondant sans doute à des espèces nettement moins mobiles. De façon intéressante, son signal peut être

modélisé par des composantes situées pratiquement aux mêmes positions que pour les autres échantillons. A nouveau, les composantes à +3 et -10,6 ppm (PRPP ?) contribuent en quantités égales au signal total. En ce qui concerne les autres pics, ceux qui correspondent aux espèces phosphates polymérisées (Q¹ du diphosphate et Q² des polymétaphosphates) sont plus intenses que dans l'échantillon précédent. Comme nous l'avons vu dans la discussion des Pi / SiO₂ (comparer notamment les Figures 6 et 7), le degré d'avancement des réactions de polymérisation dépend fortement des conditions d'activation de l'échantillon, dont la température : les particularités du spectre de 5% ribose + Pi (1:1) / SiO₂ 130°C pourraient s'expliquer si cet échantillon a subi une surchauffe accidentelle par exemple. Le temps nous a manqué pour étudier la reproductibilité de ce résultat.

Dans une dernière étape, on présente la décomposition de l'échantillon 3% R2P / SiO₂ soumis à un cycle d'hydratation + séchage (tableau V-9).

Tableau V-9: décomposition du spectre de 31 P RMN de l'échantillon 3% R2P / SiO₂ après séchage (G), et après activation à 130°C + hydratation-séchage.

δ (ppm)	% relatif en phosphore	Largeur à mi-hauteur en (ppm)
2,7	4,67	2,41
-11,2	5,19	2,41

Après le cycle d'hydratation-séchage, on observe à nouveau des pics fins correspondant à des espèces mobiles. On voit toujours deux pics sans doute attribuables au PRPP : monophosphate en 5' vers 2,7 ppm, β-Diphosphate à -11,2 ppm (ce qui représente tout de même un shift de presque 1,7 ppm). Mais la quantité relative a diminué de 7,0% à 4,9% du phosphore total. Elle est donc revenue à une valeur très proche de ce qu'elle était avant l'activation à 130°C. Cela pourrait être pris comme un indice d'une réaction réversible, dont la position d'équilibre est dictée par l'activité de l'eau à la température d'activation thermique (dans ce cas, 70°C au lieu de 130°C). Mais nous ne disposons que des résultats d'une seule expérience sur l'application d'un cycle hydratation-séchage : il pourrait s'agir d'une simple coïncidence.

ii. RMN de ^{31}P , CP (polarisation croisée)

Dans cette partie, nous avons analysé seulement deux échantillons : 3% R1P / SiO_2 , et 3% R1,5P / SiO_2 , tous deux après activation à 130°C . Les spectres obtenus sont présentés dans la figure V-18.

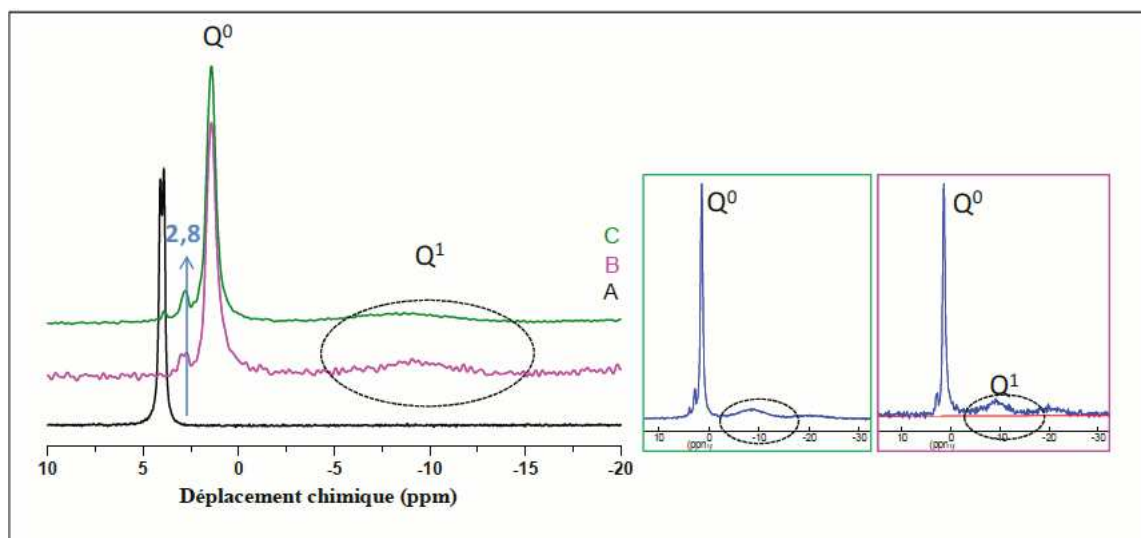


Figure V-18 : Spectres RMN CP $\{^1\text{H}-^{31}\text{P}\}$ de la référence KH_2PO_4 massique (A), de 3% R1P / SiO_2 130°C (B), et de 3% R 1,5P / SiO_2 130°C (C).

L'un des échantillons (spectre C) montre un très faible signal de KH_2PO_4 massique ; sachant que cette espèce est exaltée par la CP, les quantités de précipité doivent être négligeables. Par rapport aux trois environnements différents de Q^1 qui avaient été décelés pour Pi / SiO_2 , un seul subsiste, celui de l'espèce majoritaire à + 1,42 ppm. Mais un nouveau pic apparaît, à la position de 2,8 ppm qui correspond à celle du phosphate lié au ribose par exemple dans l'échantillon de référence Rib5'P. Il est très encourageant qu'on obtienne avec cette technique un signal incontestablement résolu, et cela renforce la confiance qu'on peut avoir dans la présence effective de ce pic, qui n'était apparent que par décomposition mathématique du signal dans les spectres 1-pulse présentés plus haut. Des signaux sont détectés aussi dans les régions Q^1 et Q^2 , mais vu leur faiblesse les ^{31}P correspondants ne sont que faiblement corrélés avec des protons, et on peut penser que ces espèces sont déprotonées, comme dans le cas des échantillons Pi / SiO_2 .

iii. ^{13}C CP RMN

Le spectre RMN de ^{13}C de l'échantillon 5% ribose + Pi (1 :1) / SiO_2 activé à 130°C est présenté dans la figure V-19. Pour la facilité de référence, on a ajouté le spectre de 10% ribose / SiO_2 , déjà discuté au chapitre II.

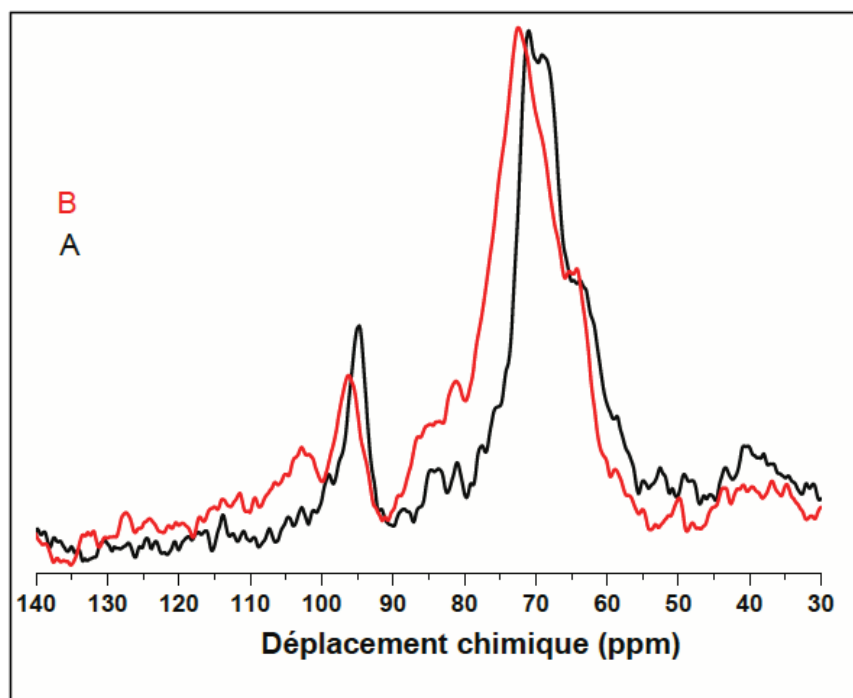


Figure V-19 : ^{13}C CP RMN de 10% Ribose / SiO_2 après séchage (A), et de 5% R1P / SiO_2 , 130°C (B).

La plupart des carbones du ribose résonnent dans la région 50-75 ppm (voir le spectre en solution, Chapitre I, figure II-14), et à l'état solide il en résulte un signal composite dont l'enveloppe peut être partiellement décomposée, mais seulement après une très longue acquisition permettant de minimiser le bruit. Par simple examen, on se rend compte que la forme de l'enveloppe est modifiée lorsque le ribose supporté a été activé en présence de phosphates, ce qui veut dire que certains carbones au moins ont été modifiés. Il existe pourtant un carbone dont le signal est nettement isolé des autres, c'est le C1 qui pour les différents anomères résonne entre 90 et 100 ppm. Or on voit que l'intensité relative dans cette région diminue en passant de ribose / SiO_2 à ribose + Pi / SiO_2 , et qu'en même temps apparaît un nouveau signal sans doute complexe entre 100 et 110 ppm (maximum vers 102 ppm). On aurait donc une modification chimique spécifique au niveau du C1 du ribose. Cela est compatible avec la formation de PRPP, molécule où les carbones C1 portent un groupe diphosphate.

La décomposition (figure V-20 et Tableau V-10) comporte une première partie contenant des pics plus ou moins bien résolus des différents environnements de C₂, C₃, C₄ et C₅. Une deuxième partie, dans la région du spectre comprise entre 100 et 120 ppm, montre les 4 pics des anomères du ribose, ainsi que quatre nouveaux environnements apparaissant à champs plus faibles. Ils sont probablement dus aux C₁ du ribose modifié.

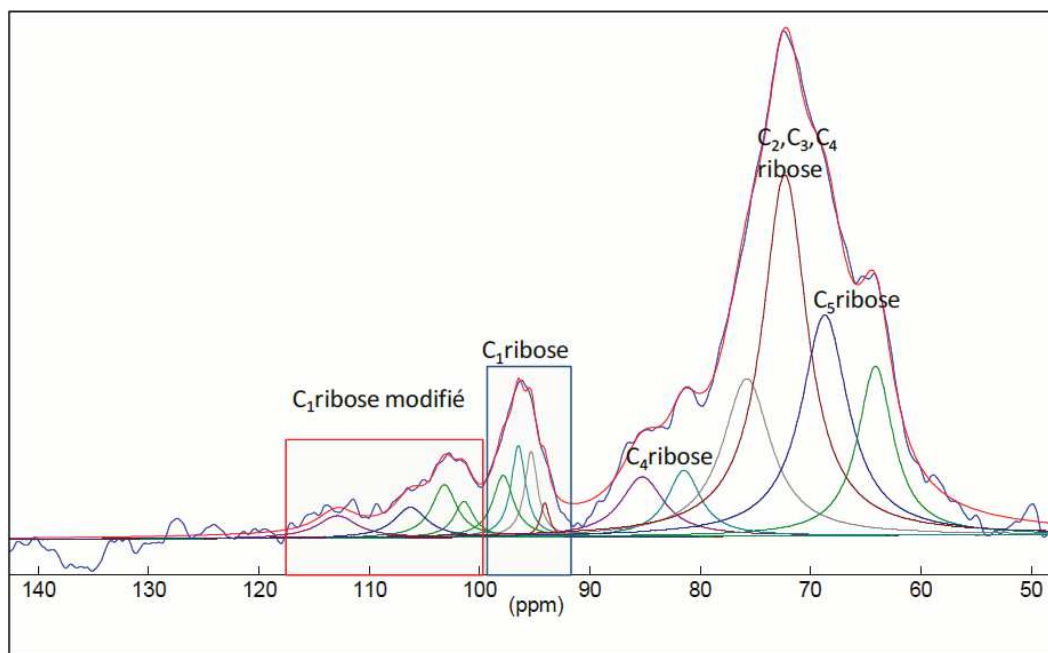


Figure V-20 : Décomposition de spectre ¹³C CP MAS de 5% R1P / SiO₂, 130°C.

Les (α, β_f) C₁ du ribose non modifié sont déplacés respectivement de -2,5 et -6 ppm par rapport à leurs équivalents du ribose / SiO₂. Ces déplacements peuvent provenir de l'interaction avec les ions K⁺ de KH₂PO₄.

Tableau V-10 : Données de décomposition des spectres RMN de ¹³C des Ribose / SiO₂ et Ribose + Pi (1:1) / SiO₂

	10% Ribose / SiO ₂	5% Ribose + Pi (1:1) / SiO ₂ , 130°C	
	C ₁ - ribose	C ₁ - ribose	C ₁ - ribose modifié
α _f	9	32	23
β _f	15	33	26
Total furanose	24	65	48
α _p	29	27,5	34
β _p	47	7,5	18
Total pyranose	76	35	52

Puisqu'il s'agit de résultats CP-MAS, les intensités des différents pics ne donnent pas directement accès aux quantités relatives des espèces correspondantes. Il existe néanmoins des tendances qui peuvent être significatives si les signaux comparés répondent de la même façon au transfert de polarisation. D'après les quantifications on observe un changement important des rapports anomériques. Dans l'échantillon ribose + phosphate / SiO₂, les formes ribo-furanoses sont beaucoup plus favorisées, par rapport aux les ribo-pyranoses, que dans l'échantillon de référence ribose / SiO₂. Cet effet est particulièrement marqué pour le ribose non phosphorylé (65% de furanoses contre 24% en l'absence de phosphate), un peu moins pour le PRPP (48% de furanoses). De même, le rapport $(\beta/\alpha)_f$ est affecté. Ce rapport diminue de 1,6 (ribose / SiO₂) à presque 1 (ribose + Pi / SiO₂). Il reste proche de 1 parmi les espèces que nous avons attribuées au PRPP. La signification de ces rapports anomériques sera considérée plus bas dans la discussion.

Il est plus délicat de comparer entre elles les intensités des pics attribués au PRPP avec celles des pics du ribose non modifié, car la phosphorylation modifie l'environnement protonique des carbones et notamment du C1. A toutes fins utiles, le rapport d'intensité entre les pics C1 attribués au PRPP et ceux attribués au ribose non modifié est de 0,97 :1.

II. Adsorption successive KH₂PO₄ et de ribose

Dans cette partie, nous avons voulu étudier la possibilité de phosphoryler le ribose par des polyphosphates préformés à la surface de la silice. Puisque nous savions (§ B de ce Chapitre) que des diphosphates et polyphosphates sont formés par condensation des monophosphates à la surface de la silice sous activation thermique modérée, nous avons d'abord adsorbé le Pi sur la silice puis activé l'échantillon par chauffage à 200°C pendant 24h. Ensuite, nous avons adsorbé par IHN le ribose sur l'échantillon obtenu. Comme cette dernière étape implique un contact de l'échantillon solide avec une solution aqueuse, un traitement qui n'est pas innocent pour les réactions de condensation, nous avons aussi dans certains cas étudié l'effet du contact dans les mêmes conditions avec de l'eau distillée.

II.1 DRX

La figure V-21 montre les diffractogrammes de Rayons X obtenus pour les différents échantillons.

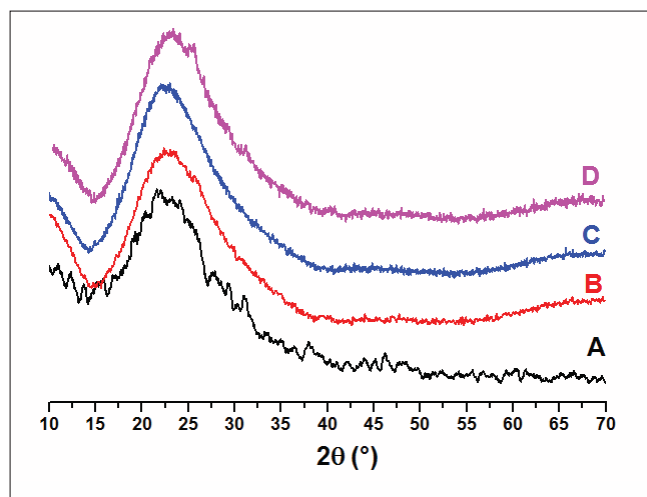


Figure V-21 : diffractogrammes de 10% Pi / SiO₂, à 70°C (A) et après activation à 200°C, 24h (B) ; le même, après exposition à l'eau (10% Pi / SiO₂, 200°C, hydr) (C), et Ribose/ (10% Pi / SiO₂, 200°C) (D).

Comme décrit précédemment (diffractogramme A), l'échantillon à 10% Pi / SiO₂ ne contient pas de précipité massique. Le chauffage de cet échantillon à 200°C/24h (diffractogramme B) puis l'exposition à l'eau (diffractogramme C) ne provoque pas l'apparition de précipité de phosphate. Par contre, une faible quantité de KH₂PO₄ précipitée est présente après l'adsorption IHN de ribose (pic à 25°, diffractogramme D).

II.II RMN

i. RMN de ³¹P

Le spectre RMN de ³¹P de l'échantillon préparé par adsorptions successives de phosphate et de ribose ainsi que ceux des références sont présentés dans la fig. V-22.

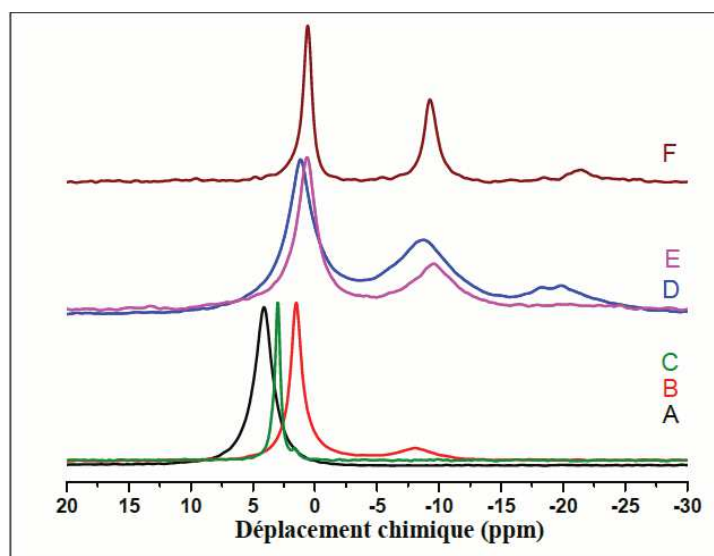


Figure V-22 : RMN ³¹P 1-pulse de KH₂PO₄ massique, (A), 10%Pi / SiO₂ (B), Rib5'P (C), 10% Pi-SiO₂, 200°C (D), Ribose/(10% Pi / SiO₂, 200°C) (E), et (10% Pi-SiO₂, 200°C, hydr) (F).

Après activation thermique de 10%Pi/SiO₂ à 200°C/24h (D), les pics caractéristiques de Q⁰ et Q¹ deviennent plus larges ce qui correspond à des espèces peu mobiles. Le pic caractéristique de Q¹ devient plus intense et de nouveaux environnements de polyphosphates (Q²) apparaissent dans la région comprise entre -15 et -25 ppm. Toutes ces observations sont compatibles avec celles qui ont été rapportées plus haut pour une activation à température plus basse, à 130°C (Figure V-4).

Après adsorption de ribose sur cet échantillon contenant des polyphosphates (spectre E), on remarque un petit déplacement de Q⁰, une diminution de la quantité relative de Q¹, et surtout une quasi disparition des Q². Cette perte de polyphosphates pourrait avoir plusieurs origines : une simple hydrolyse, ou une réaction avec le ribose. Il est donc important de comparer l'échantillon sur lequel on a déposé du ribose en solution, à celui qui a simplement été contacté avec de l'eau distillée (spectre F). Ce dernier montre des pics très fins, c'est-à-dire des molécules plus mobiles que dans les deux échantillons précédents. Les deux environnements Q¹ et Q² sont toujours présents dans le spectre. Les Q² ont diminué en proportion relative par rapport à l'échantillon 10%Pi/SiO₂, 200°C. Les quantifications des spectres sont détaillées à la Figure IV-23 et au Tableau V-11.

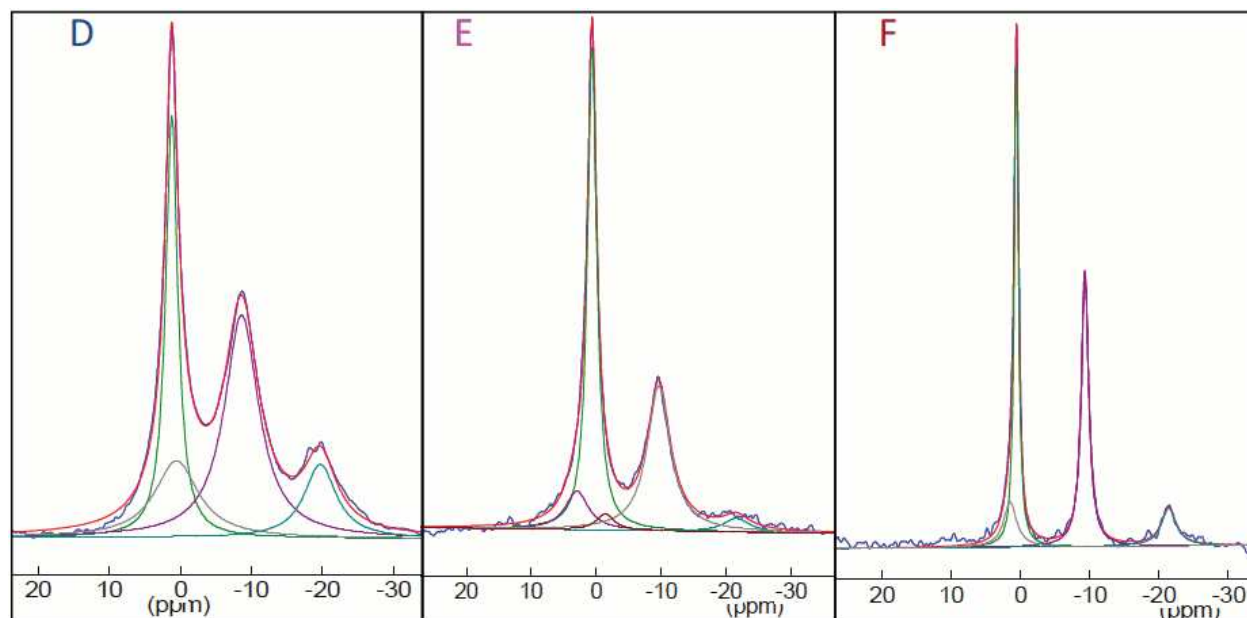


Figure V-23 : Décompositions des spectres RMN de ³¹P de 10%Pi / SiO₂, 200°C (D), Ribose/(10% Pi / SiO₂, 200°C) (E), et (10% Pi-SiO₂, 200°C, hydr) (F).

Tableau V-11 : Données de décomposition des spectres RMN de ^{31}P de Pi / SiO₂, Ta et 200°C, et Ribose + Pi / SiO₂, Ta et 200°C.

		δ (ppm)	% / phosphore total	largeur à mi-hauteur (ppm)
Pi-SiO ₂ , Ta	Q ⁰	+1,5	63	1.06
		+0,8	22	3.08
		% de Q⁰	85%	
	Q ¹	-8,0	15,5	3.34
Pi-SiO ₂ , 200°C/24h	Q ⁰	+1,2	28	2.09
		+0,5	18	7.4
		% Q⁰	46%	
	Q ¹	-8,7	41	5,8
	Q ²	-19,8	13	5,4
Rib/(10% Pi-SiO ₂ , 200°C)	Q ⁰	+2,95	9,5	4,26
		+0,6	48	1,72
		-1,3	3	3,34
		% de Q⁰	60,5%	
	Q ¹	-9,65	36	4,3
	Q ²	-21,6	4	4,82
eau/(10% Pi-SiO ₂ , 200°C)	Q ⁰	+1,5	11	2.22
		+0,6	39	0.7
		% Q⁰	50%	
	Q ¹	-9,3	39	1.27
	Q ²	-21,4	11	2.56

Rappelons qu'après séchage on observe sur Pi / SiO₂ (partie A) deux environnements de Q⁰ à 1,5 et 0,8 ppm et un environnement Q¹ à -8,0 ppm, pour un taux de condensation de 15,5%. Après chauffage de l'échantillon à 200°C, un nouvel environnement Q² s'ajoute aux trois déjà présents. Le pourcentage de Q⁰ diminue de presque la moitié tandis que le % de Q¹ augmente de 15,5 à 41,3% avec apparition de 13% de Q²: des diphosphates et polyphosphates se sont formés, avec un taux de condensation de 54%.

L'adsorption IHN du ribose sur cet échantillon se traduit par plusieurs changements dans le spectre RMN de ^{31}P . D'abord, on détecte une disparition de l'environnement à 1,18 ppm.

Ensuite, deux nouveaux environnements de Q^0 apparaissent à 2,95 et -1,3 ppm. Le premier pic, comme il a déjà été proposé, pourrait correspondre à du ribose phosphorylé en position 5' et représente presque 10% de la quantité totale de phosphore. D'autre part, globalement, on observe après dépôt du ribose et séchage une augmentation de +14,5% des Q^0 et une diminution de 5,5 % des Q^1 , et -9% des Q^2 . Le %age de diminution des Q^2 est presque égal au %age du nouvel environnement formé à +2,95 ppm, tandis que le % de diminution de Q^1 est presque égal au % age du nouvel environnement formé à -1,3 ppm. A noter par contre que, contrairement aux expériences d'adsorption simultanée, on n'observe pas la présence d'un signal Q^1 vers -10 ppm.

Tous ces résultats seraient compatibles avec un modèle où les polyphosphates (Q^2) seraient les principaux responsables de la phosphorylation du ribose (probablement uniquement en 5', contrairement à l'adsorption simultanée), tandis que les diphosphates (Q^1) se transformeraient en monophosphates par hydrolyse.

La simple réhydratation de l'échantillon par contact avec de l'eau distillée cause elle aussi une augmentation du pourcentage de Q^0 et une diminution des pourcentages des Q^1 et Q^2 .

En même temps on remarque qu'aucun signal n'est observé au voisinage de -1,3 ppm. Le pic qui se situait à cette position dans l'échantillon Ribose / (10% Pi / SiO₂, 200°C) semble donc être dû à un produit de phosphorylation de ribose, différent du ribose-5'-phosphate et du PRPP. Il pourrait éventuellement s'agir d'une phosphorylation en une autre position.

ii. CP-RMN de ¹³C

Dans la figure V-24, nous avons superposé le spectre ¹³C CP RMN de l'échantillon préparé par adsorption successive avec ceux de 5% ribose + Pi (1 :1) / SiO₂, 130°C et de 10% ribose / SiO₂.

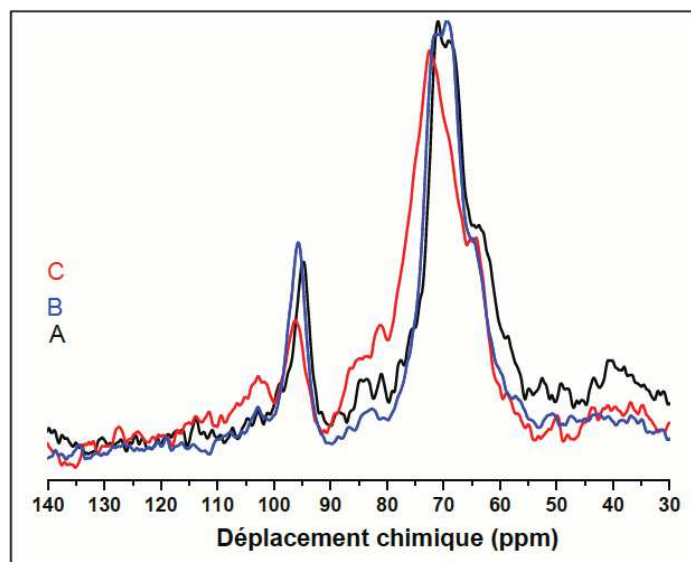


Figure V-24 : ^{13}C CP RMN de 10% ribose / SiO_2 (A), 10% ribose / (10%Pi / SiO_2 , 200°C) (B) et 5% R1P / SiO_2 , 130°C (C).

Le spectre de l'échantillon préparé par imprégnations successives, ribose / (10%Pi / SiO_2 , 200°C), est très proche de celui de l'échantillon sans phosphate, 10% ribose / silice. Cependant, ces deux spectres ne sont pas superposables dans la région des C_5 où l'échantillon par imprégnations successives ressemble plutôt à celui préparé par co-adsorption (C).

En revanche, dans la région de C_1 , le spectre de l'échantillon préparé par imprégnations successives ne montre pas les nouveaux environnements du carbone qui étaient apparents sur le spectre de l'échantillon préparé par co-adsorption, et que nous avons attribué à la formation d'un pyrophosphate. Au contraire, on n'observe que des pics aux positions caractéristiques des anomères du ribose, à la même intensité relative que pour 10 % ribose / SiO_2 .

Toutes ces observations sont compatibles avec la formation de ribose-5'-monophosphate, et peut-être d'un ribose monophosphorylé sur une autre position, mais pas de PRPP.

III. Discussion : phosphorylation du ribose

Les données d'ATG, de RMN de ^{31}P et de RMN de ^{13}C fournissent des indices précis de phosphorylation du ribose supporté, par activation thermique. Cependant, le chemin réactionnel suivi dépend de la procédure d'activation utilisée. En effet, des produits différents sont observés selon qu'on active un mélange de ribose et de phosphate coadsorbés, ou qu'on forme d'abord des polyphosphates et qu'on dépose le ribose ensuite.

III.I Coadsorption ribose-phosphate : formation de PRPP

Lors de la planification des expériences, nous nous attendions à observer (éventuellement) des produits de monophosphorylation du ribose, ce qui justifiait l'utilisation de ribose-5'

phosphate (R5'P) comme produit de référence. L'analyse de la RMN du ^{31}P nous a vite suggéré que les choses étaient plus complexes. La décomposition des spectres 1-pulse indiquait bien une composante centrée à une position très proche du R5'P uniquement, dans la région $Q^0(1C)$, confirmée plus tard par l'observation d'un signal bien résolu en CP-MAS ; mais en même temps, et en quantités pratiquement équivalente, on observait un signal dans la région des Q^1 , qui indique la présence d'une liaison anhydride phosphorique, P-O-P. La molécule de PRPP, bien connue en biochimie comme intermédiaire dans le métabolisme contemporain, constituait un candidat assez tentant pour expliquer ces observations. Les structures moléculaires de R5'P et de PRPP sont comparées à la Figure V-25.

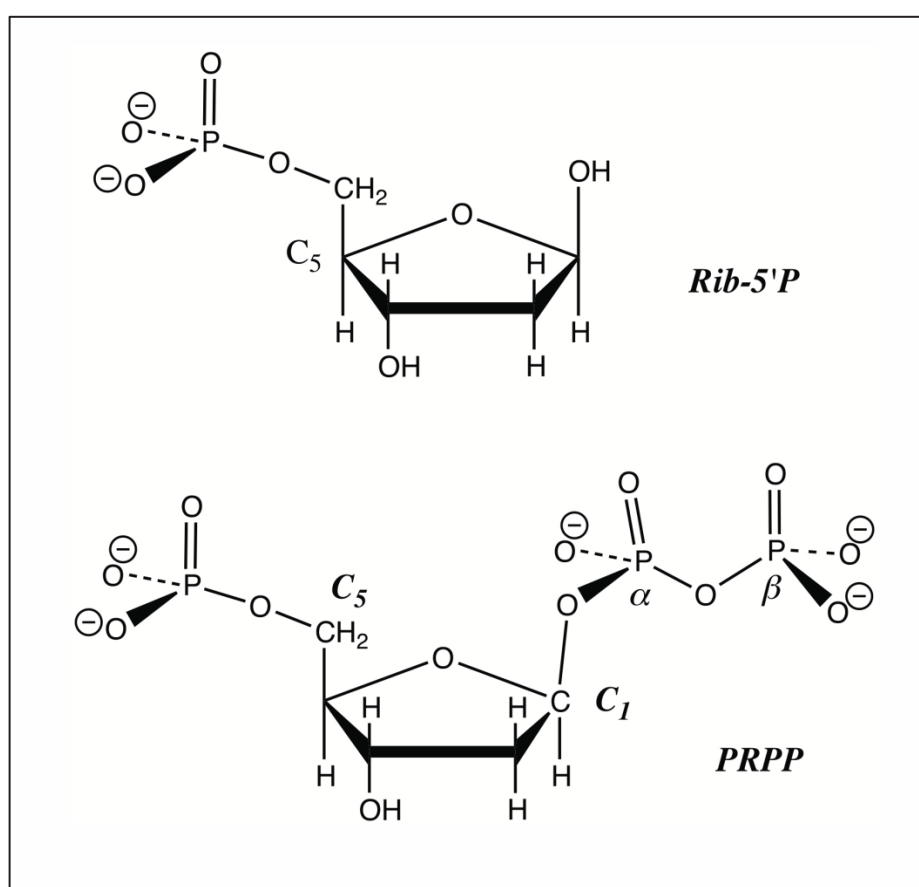


Figure V-25 : Structures de R5'P et PRPP

On voit que dans les deux molécules, le C5 porte un groupe phosphoryl qui se trouve dans le même environnement moléculaire local. Dans le PRPP, le C1 porte de plus un groupe pyrophosphate contribuant deux environnements supplémentaires du phosphore. Le phosphore noté α est en environnement $Q^1(1C)$; le phosphore noté β est en environnement $Q^1(0C)$. D'après la littérature⁶, ils sont attendus respectivement vers -7 et -10 ppm. Dans nos échantillons, on n'observe que le pic caractéristique des phosphores β vers -10 ppm. Peut-être

le α - diphosphate est-il masqué par le second pic de Q¹ dû aux pyrophosphates inorganiques, qui restent majoritaires même en présence de ribose ; dans un cas, celui de l'échantillon de 3% ribose + Pi (1:2) / SiO₂, on observe vers -6 ppm un environnement supplémentaire qui pourrait correspondre au phosphore α . On peut noter finalement qu'en CP-MAS, le pic que nous avons attribué au phosphore β n'est pas observé ; il est probable que dans les conditions de surface, le phosphate β est déprotoné, tandis que les hydrogènes portés par les carbones sont trop éloignés pour assurer le transfert de polarisation.

La RMN de ¹³C est compatible avec la présence de PRPP ; elle confirme en tout cas une modification significative de l'environnement du carbone C1 d'une partie des molécules de ribose lors de l'activation thermique en présence d'ions phosphates. Plusieurs signaux nouveaux (les anomères du PRPP ?) apparaissent près de la région C1, mais déplacés vers les champs faibles ce qui est logique vu l'effet électroattracteur d'un groupe phosphate ; en même temps, les pics du ribose modifié sont toujours présents mais moins intenses. Quant au carbone C5, son signal est plus difficile à discriminer vu les recouvrements, mais une modification partielle semble bien avoir lieu également.

Un dernier indice de la phosphorylation est fourni par les ATG. En effet, le premier évènement thermique a lieu à une température significativement plus basse lorsque phosphate et ribose sont présents ensemble sur la surface que pour le phosphate seul, ou le ribose seul. Cet évènement correspond donc à une réaction entre les deux partenaires, probablement une condensation entre des groupes P-OH et C-OH dégageant de l'eau.

III.II Quantification de la phosphorylation

Si on accepte que le PRPP se forme, quel est le rendement de cette réaction ? Remarquons tout d'abord que les conditions choisies pour cette étude ne permettaient pas une transformation totale du ribose, ce qui nécessiterait un rapport molaire (phosphate : ribose) d'au moins 3 : 1. Comme nous l'avons déjà dit, la formation de cette molécule a été un résultat inattendu ; nous nous attendions à obtenir des molécules contenant moins de groupes phosphates et avons fixé les rapports molaires en conséquence.

Nous avons présenté plus haut des données quantitatives obtenues par RMN du ³¹P, et par RMN du ¹³C. La RMN peut permettre des quantifications relatives, à condition d'utiliser des résultats 1-pulse obtenus avec des temps de recyclage assez élevés (supérieurs à 5 T₁). En revanche, les intensités des pics dans les expériences CP-MAS dépendent non seulement de

l'abondance relative des différents environnements, mais aussi de l'efficacité du transfert de polarisation. Comme les spectres RMN du ^{13}C sont obtenus par CP-MAS, ils ne peuvent servir de base de quantification.

Le Tableau V-12 et le schéma V-1 reprennent les données quantitatives correspondant à tous les échantillons analysés par RMN du ^{31}P .

Tableau V-12 : Données de décomposition des spectres RMN de ^{31}P : quantification de la formation de PRPP

Echantillon	Charge en ribose (%)	Charge en phosphate (%)	% de ribose transformé en PRPP	% du phosphate fixé sur le ribose
3% R1P / SiO ₂	3	2,72	3,8	11,4
3% R2P / SiO ₂	3	5,44	4,9	7,35
5% R1P / SiO ₂	5	4,53	7,9	23,7
5% R2P / SiO ₂	5	9,06	9,5	14,25
3% R1P / SiO ₂ , 130°	3	2,72	5,0	15
3% R2P / SiO ₂ , 130°	3	5,44	7,05	10,6
5% R1P / SiO ₂ , 130°	5	4,53	9,5	28,5
5% R2P / SiO ₂ , 130°	5	9,06	11,5	17,25

A noter que pour l'échantillon 5% R1P / SiO₂, le rendement de la phosphorylation, exprimé par rapport au ribose, est de 7,9% ; alors qu'en RMN CP-MAS de ^{13}C , l'intensité des pics C1 attribués au PRPP représentait 49% de l'intensité totale des C1. Cela donne une idée des différences d'efficacité du transfert de polarisation en CP, qui dans ce cas aboutirait à surestimer le rendement de phosphorylation d'un facteur 5 environ.

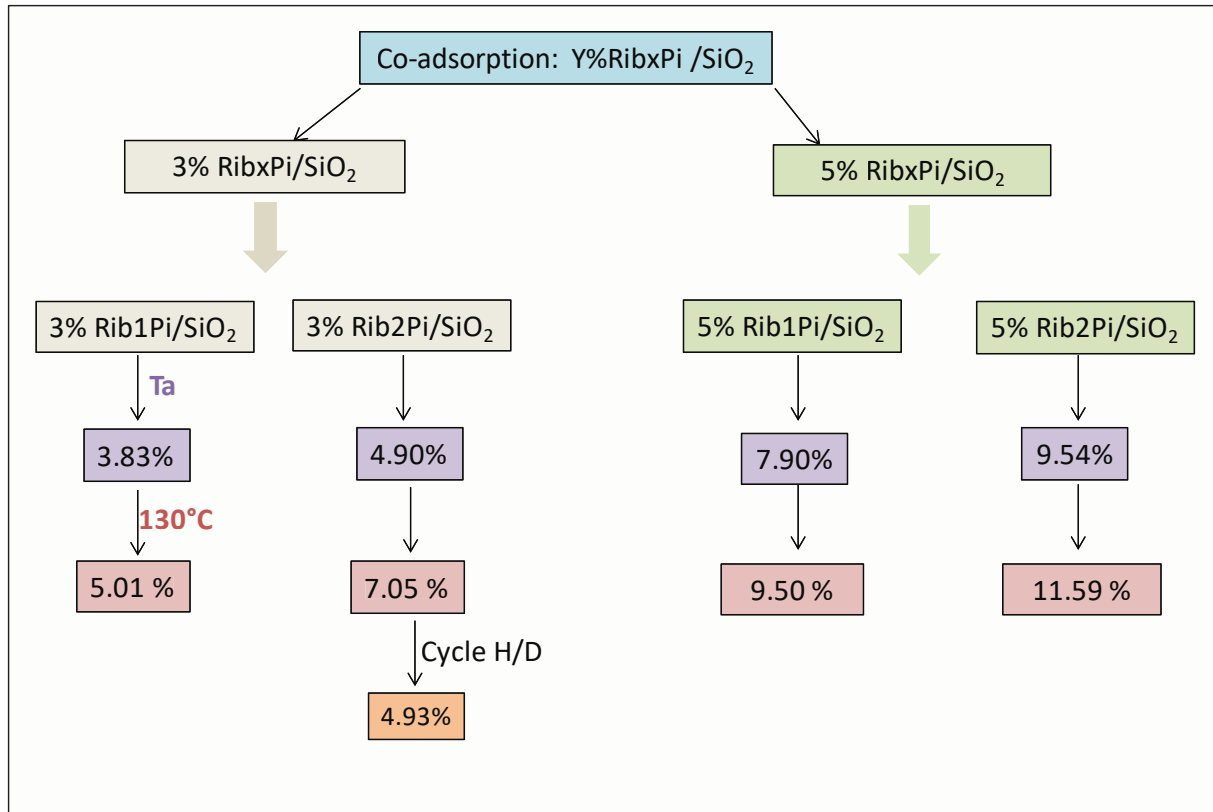
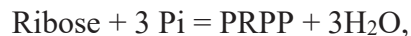


Schéma V-1 : Schéma récapitulatif de % relatifs en PRPP dans les différents échantillons préparés.

De façon surprenante, la formation de PRPP est déjà bien avancée après séchage à 70°C, bien que les espèces de surface soient encore assez mobiles à ce moment. La mobilité ne signifie sans doute pas que les espèces se trouvent dans une solution solide supportée, car une activité de l'eau trop importante rendrait la formation de PRPP défavorable, comme elle l'est en solution. En effet, la réaction peut s'écrire :



L'eau apparaissant comme un produit (loi de Le Châtelier).

La constante de réaction devrait s'écrire.:

$$K = \frac{a_{\text{PRPP}} (a_{\text{H}_2\text{O}})^3}{a_{\text{R}} (a_{\text{Pi}})^3}$$

Les données sont difficiles à interpréter numériquement car nous ne savons pas si la réaction est sous contrôle thermodynamique ou cinétique, et d'autre part il est difficile d'évaluer précisément l'activité de l'eau. On doit se limiter à constater des tendances globales. On voit que l'augmentation de la charge en ribose, et donc de sa concentration surfacique, en gardant le rapport Pi/ribose constant augmente le rendement de la formation de PRPP, comme attendu pour une réaction de condensation. D'autre part, l'augmentation de la charge en phosphate en gardant la charge en ribose constante augmente aussi ce rendement, mais dans des proportions moindres, contrairement à ce que laisse attendre l'expression de la constante d'équilibre. Cela suggère que la réaction n'est probablement pas sous contrôle thermodynamique ; mais un traitement complet de la question devrait aussi prendre en compte la compétition des réactions de phosphorylation du ribose avec celles de polymérisation des phosphates, et serait donc très complexe.

La conclusion finalement la moins contestable est aussi la plus simple : les rendements de la réaction de formation du PRPP à partir de ribose sont loin d'être négligeables, puisqu'ils dépassent les 10% - ce qui n'est pas si fréquent pour les réactions supposées prébiotiques. La coadsorption de ribose et de phosphate aboutit donc à l'obtention de quantités significatives d'une molécule activée, et même fortement activée avec son groupe diphosphoryl en C1 - une molécule qui pourrait jouer un rôle comme intermédiaire vers d'autres réactions de fonctionnalisation, comme on le verra dans le paragraphe final de ce chapitre.

Notons pour terminer qu'après avoir formulé l'hypothèse de la formation de PRPP, nous avons tenté d'exalter cette réaction en introduisant des phosphates dans un rapport molaire suffisant pour assurer une transformation totale du ribose en cette molécule. Etant donné qu'il faudrait pour cela 3 molécules de phosphate par ribose, on a préparé une série d'échantillons contenant 3% de ribose et 3 équivalents molaires en phosphate. Cependant, on a observé des précipités de phosphate massique en DRX. Ceci indique que la surface est déjà saturée en phosphates et qu'une augmentation de la charge au-delà des quantités précédemment présentées n'est pas pertinente.

III.III Le PRPP comme intermédiaire vers la formation de nucléotides

Nous avons mentionné plus haut le fait que les isomères furanoses du ribose semblent particulièrement favorisés dans les échantillons ribose + Pi / SiO₂. Cette sélectivité pour les anomères furanoses est intéressante d'un point de vue prébiotique, puisque les nucléosides et

nucléotides contiennent uniquement la forme furanose. Nous proposerons plus loin que le PRPP puisse représenter un intermédiaire dans la synthèse prébiotique de nucléotides : ceux-ci seraient formés par une fixation des nucléobases sur le C1', le groupe diphosphate jouant le rôle de groupe partant.

De même, le rapport $(\beta/\alpha)_f$ diminue en comparaison de ribose / SiO₂ : l'isomère α_f est particulièrement bien représenté dans les échantillons ribose + Pi / SiO₂, aussi bien d'ailleurs pour le ribose non modifié que pour les PRPP qui en sont dérivés. Pour comprendre la signification de ce résultat, il faut rappeler le mécanisme de glycosylation présenté dans le 1^{er} chapitre : l'ajout d'une base azotée en position 1' du ribose provoque une inversion anomérique. En d'autres termes, pour avoir un β_f -nucléoside (la forme exclusivement présente en biochimie) il faut glycosyler un α_f -ribose. Or ceux-ci sont favorisés dans le précurseur supposé. Cela est évidemment encourageant, mais deux remarques incitent à la prudence :

- Nous ne connaissons pas d'étude sur les formes anomériques du PRPP. Notre attribution des différents signaux RMN de ¹³C est basée sur l'hypothèse que leurs déplacements chimiques s'ordonnent de même façon que ceux des formes correspondantes du ribose, ce qui est logique mais pas complètement certain.

- On pourrait se demander pourquoi la présence de phosphates à la surface de la silice modifie fortement les équilibres anomériques du ribose non phosphorylé, aussi bien (et même davantage) que ceux du PRPP. Cela n'est pas forcément impossible s'il existe une interaction non-covalente mais spécifique (liaisons H ?) entre ribose et anions phosphates à la surface de la silice: une telle interaction pourrait expliquer à la fois la sélection anomérique, les déplacements chimiques des pics du ribose lui-même, et son activation vis-à-vis des réactions de phosphorylation.

III.IV Adsorptions successives de ribose-phosphate: mono-phosphorylation ?

Nous avons remarqué plus haut que la procédure par adsorption successive de phosphate puis de ribose ne cause pas l'apparition du signal ³¹P caractéristique du ribose diphosphorylé (région Q¹, entre -9 et -11 ppm). La monophosphorylation en position C5 est par contre probable vu l'apparition d'un signal caractéristique à la même position que pour le ribose-5'phosphate. Une ambiguïté subsiste pour l'interprétation du nouveau signal à -1,3 ppm qui apparaît en même temps. Pourrait-il s'agir d'une monophosphorylation du ribose sur d'autres positions que le C5? Nous ne connaissons pas de référence dans la littérature pour ce genre de

composés. Cependant, des études existent pour certains hexoses phosphorylés. On sait qu'il est possible de différencier par RMN de ^{31}P le glucose-1-phosphate du glucose-6-phosphate qui apparaissent respectivement à 3,2 et 5,4 ppm⁷. Nous avons donc réalisé des simulations de ^{31}P RMN sur une molécule de ribose phosphorylé sur toutes les positions possibles (1', 2', 3', 4' et 5') suivant le programme ACD Lab. Les résultats obtenus ont montré la dépendance des déplacements chimiques de la position de phosphorylation. Il est donc possible qu'il y ait en parallèle monophosphorylation en C5 et sur une autre position, ce qui voudrait dire que la phosphorylation n'est pas complètement sélective ; mais cette hypothèse ne peut pas être considérée comme fermement démontrée.

IV. Conclusions :

La question qui motivait principalement notre étude était de déterminer si un "scénario interfacial", c'est à dire se produisant à la surface de phases minérales, pouvait induire la formation de ribose phosphorylé. Les sucres phosphorylés constituant l'archétype de molécules "riches en énergie", une telle formation constituerait une étape prometteuse pour la chimie prébiotique, car elle entraînerait une activation du ribose lui permettant ultérieurement de participer à des réactions de complexification normalement interdites thermodynamiquement lorsque le ribose n'est pas phosphorylé (nous pensons bien sûr entre autres à la formation de liaisons N-glycosidiques avec des nucléobases, dont il sera question dans le paragraphe suivant).

De ce point de vue, notre étude est un succès puisque des dérivés phosphorylés du ribose ont été obtenus avec des rendements égaux ou supérieurs à 10%, ce qui est très appréciable par rapport aux rendements ordinairement obtenus dans les synthèses prébiotiques. D'autre part, on peut noter une grande sélectivité de phosphorylation pour les seules positions 1' et 5'. Un travail ultérieur devra s'attacher à comprendre cette sélectivité. La procédure que nous avons étudiée le plus profondément, à savoir la coadsorption de ribose et de monophosphates, a en fait abouti à un type d'activation que nous n'avions pas anticipée, avec la formation de PRPP : celle-ci implique une monophosphorylation en C5' du ribose, mais aussi une diphosphorylation en C1'. La molécule est donc plus fortement activée que ce ne serait le cas pour une simple monophosphorylation. En revanche, le PRPP ne se forme pas si l'on applique une procédure différente, que nous avons appelée "adsorption successive" (formation de polyphosphates par activation de Pi / SiO_2 , suivie de dépôt du ribose). Dans ce cas, on n'obtient qu'une monophosphorylation, soit une activation moins profonde - ou peut-être des

monophosphorylations en plusieurs positions, ce qui rendrait le résultat encore moins intéressant vu le manque de sélectivité.

D'un point de vue purement pragmatique, ces différences attirent notre attention sur la complexité de la chimie de surface des biomolécules, qui doit être étudiée d'une façon beaucoup plus rigoureuse que ce n'est généralement le cas. D'un point de vue plus fondamental, ces différences de comportement suggèrent fortement la formation de *complexes ternaires* ribose / phosphate(s) / surface de silice : nous pensons qu'une compréhension moléculaire précise de la structure de ces complexes pourrait expliquer l'activation très spécifique qu'on constate expérimentalement. Une telle compréhension n'est pas inaccessible mais nécessiterait un effort concerté, expérimental (techniques RMN avancées^{3, 8}) et théorique (modélisation moléculaire⁹).

L'existence d'interactions très spécifiques entre le ribose et les phosphates adsorbés permettrait aussi de rationaliser les fortes modifications de sélectivité énantiomérique entre le ribose adsorbé seul, et le ribose coadsorbé avec des monophosphates. Il est bien sûr intéressant que ces modifications aillent dans le sens correspondant aux sélectivités effectivement observées pour les réactions biologiques (sélection des furanoses, et plus précisément de la forme α du PRPP qui permettrait d'expliquer pourquoi les nucléotides sont β).

Les biochimistes se demanderont certainement d'où vient l'enthalpie libre nécessaire pour réaliser la phosphorylation du ribose. Les réactions impliquées sont des réactions de condensation entre groupes -OH, entraînant l'élimination de molécules d'eau. C'est pourquoi elles ne sont pas favorables thermodynamiquement en solution aqueuse (principe de Le Châtelier). Elles partagent ces caractéristiques avec d'autres réactions qui sont défavorisées en solution aqueuse mais capables de se dérouler extensivement à l'état adsorbé sur silice, notamment les condensations de liaisons peptidiques entre acides aminés qui ont été largement étudiées¹⁰. Dans ce cas, le moteur thermodynamique de la condensation est simplement la possibilité de déshydrater extensivement la surface par activation thermique : la forte diminution de l'activité de l'eau qui en résulte déplace la condensation vers la droite, toujours en vertu de ce même principe de Le Châtelier.

Toutefois, dans le cas des acides aminés, une condensation extensive n'est généralement obtenue que par activation à des températures assez élevées (130-150°C); ici, nous avons observé une phosphorylation significative déjà après séchage à 70°C, une activation ultérieure à 130°C n'induisant qu'une augmentation assez limitée du taux de phosphorylation. Il est clair

qu'une étude plus poussée est nécessaire, notamment pour séparer les effets thermodynamiques des effets cinétiques.

C. Réaction du ribose avec l'adénine sur la surface de la silice

Dans cette partie nous avons voulu déterminer la possibilité de glycosylation de nucléobases par le ribose, en présence et en absence du phosphate inorganique. La base azotée utilisée est l'adénine. Tous les échantillons ont été préparés par co-adsorption de leurs constituants suivant la méthode IHN (excès d'eau) avec des densités massiques qui seront détaillées dans les parties suivantes.

I. En absence de phosphate inorganique

Dans un premier temps, on a étudié la réaction du ribose avec l'adénine en absence de phosphate inorganique. Pour cela, on a co-adsorbé 3% d'adénine avec 1 équivalent molaire de ribose suivant la méthode par imprégnation avec excès d'eau (échantillon noté AR / SiO₂).

I.1 DRX

Le diffractogramme de AR / SiO₂ (C) est superposé avec ceux des références d'adénine massique (A) et d'adénosine massique (B) dans la figure V-26.

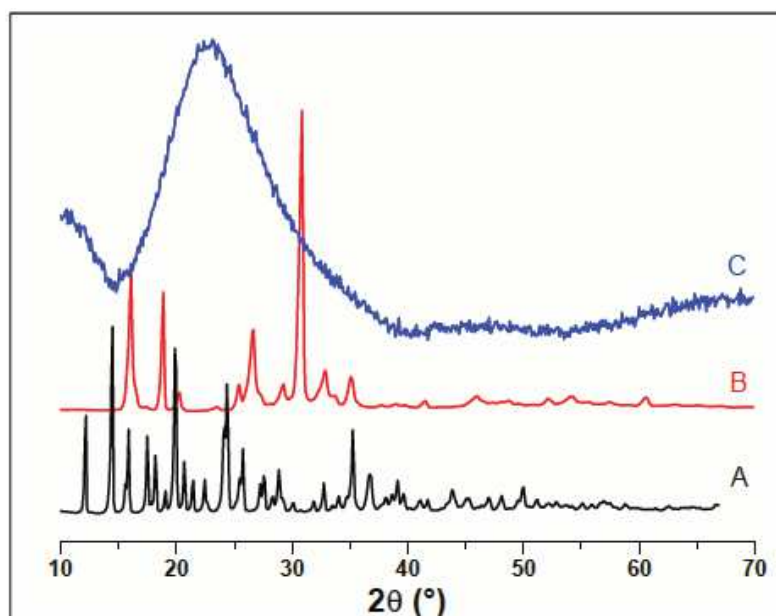


Figure V-26 : analyse DRX de l'adénine massique (A), de l'adénosine massique (B) et de AR / SiO₂ (C).

Le diffractogramme C ne présente qu'un pic large caractéristique de la silice amorphe. On peut donc faire l'hypothèse que toutes les molécules d'adénine sont dispersées sur la surface. Il n'est pas possible de conclure rigoureusement en ce qui concerne le ribose, car celui-ci peut

être présent sous forme de solutions supportées très concentrées même pour un taux d'hydratation du solide peu élevé¹¹.

I.II Analyse thermogravimétrique (ATG)

Nous avons étudié les thermogrammes d'échantillons de référence adénine / SiO₂, adénosine / SiO₂, et AMP / SiO₂, dans l'espoir de les comparer à ceux des échantillons obtenus par activation de l'adénine et du ribose coadsorbé. Malheureusement, les molécules en question ne donnent que des événements thermiques larges et mal définis, ce qui rend difficile d'utiliser l'ATG comme "empreinte digitale" dans ces systèmes. Nous n'avons donc pas approfondi davantage l'utilisation de cette technique.

I.III Spectroscopie IR

Contrairement au ribose, l'adénine présente plusieurs bandes dans l'IR moyen dans la région de transparence de la silice. Tout d'abord, on a étudié la réactivité thermique de l'adénine après adsorption sur la surface de la silice (5% A / SiO₂). Les spectres obtenus ainsi que les attributions des bandes sont présentés dans la figure V-27.

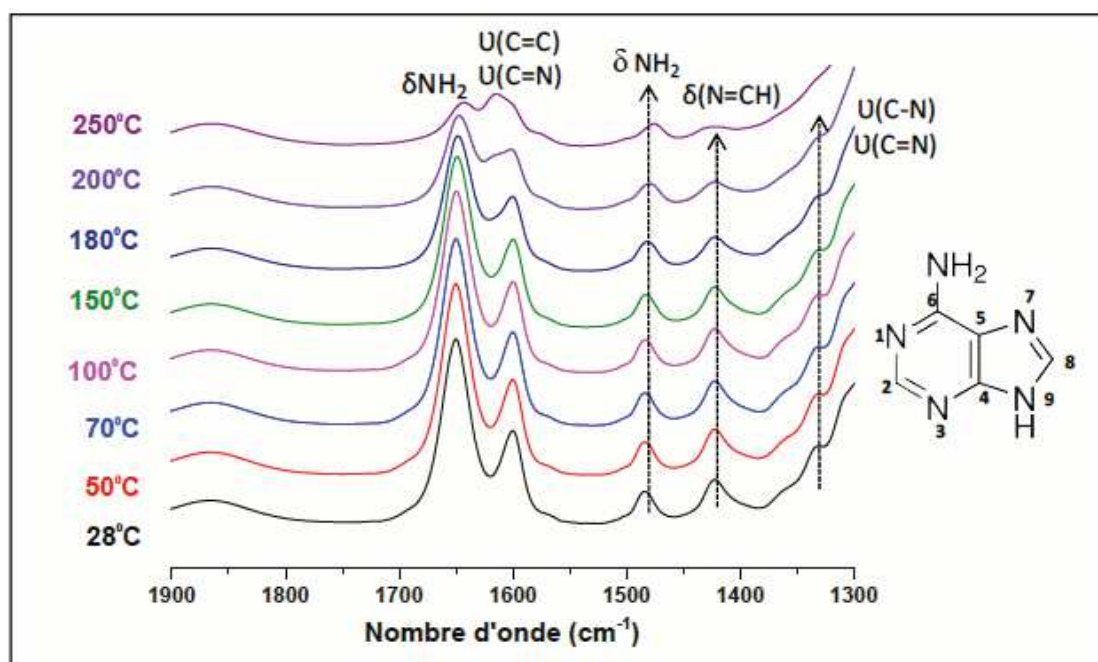


Figure V-27 : analyse FTIR de 5% adénine-SiO₂.

En se référant à la bibliographie, on a pu attribuer toutes les bandes obtenues. Cependant, on remarque un déplacement de (+ 25 cm⁻¹) de δ NH₂ qui apparaît à 1675 cm⁻¹ alors que *Mathlouthi et al.* l'observent à 1650 cm⁻¹ dans l'adénine massique. Cette bande apparaît aussi à 1470 cm⁻¹ tandis qu'elle se déplace vers 1484 cm⁻¹ (+14 cm⁻¹) après adsorption sur la silice.

Aucun déplacement n'est observé sur les autres bandes. On peut penser que l'adénine interagit avec la surface de la silice par l'intermédiaire du groupement NH_2 ; celui-ci pourrait éventuellement agir comme accepteur d'une liaison hydrogène avec un groupement silanol (Si-OH).

D'autre part, l'activation thermique de l'échantillon jusqu'à une température de 200°C ne provoque aucun changement dans le profil de spectre, A partir de 200°C , une bande de vibration correspondant au $\nu\text{C}=\text{C}$ apparaît sans pour autant que cela nous permette de conclure sur la nature des changements.

Ensuite, on a analysé l'adénosine massique et adsorbée sur la surface de la silice (5%Ads / SiO_2). Les spectres sont présentés dans la figure V-28.

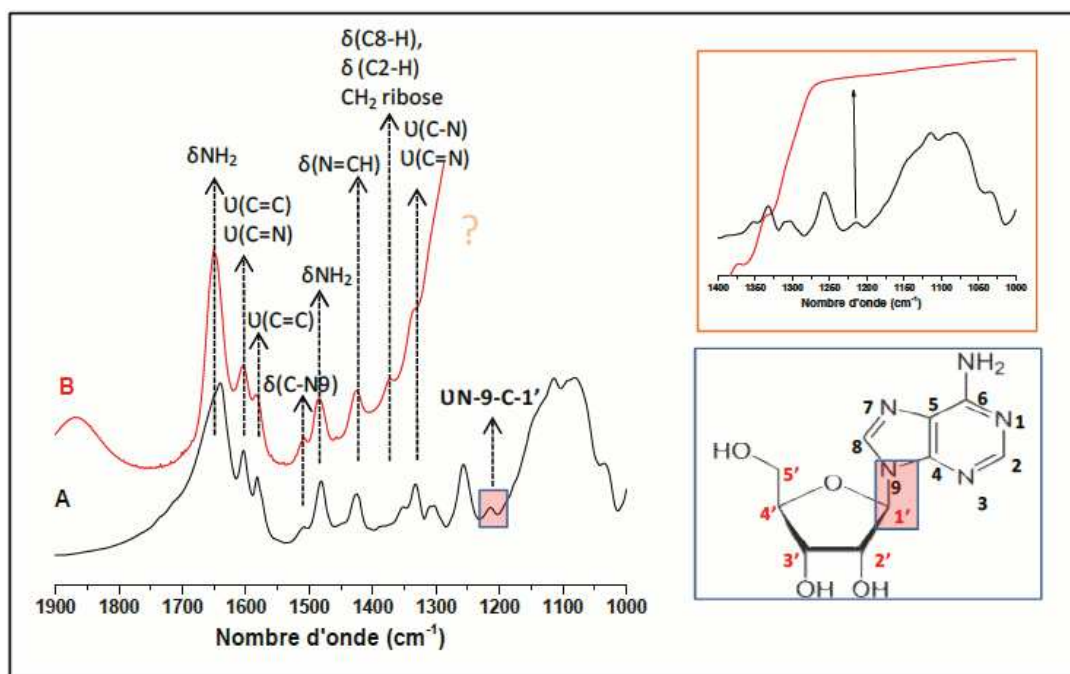


Figure V-28 : analyse FTIR de l'adénosine massique (Ads) en pastille KBr (A) et de 5%Ads / SiO_2 (B).

Les deux spectres présentent les mêmes positions de bandes pour presque tous les groupements fonctionnels détectés. Cependant, un décalage de -11cm^{-1} est observé pour le δNH_2 après adsorption à la surface de la silice.

Une question importante pour mettre en évidence une éventuelle réaction entre adénine et ribose est de savoir s'il existe des bandes caractéristiques de l'adénosine, et absentes dans l'adénine, ou tout au moins des bandes significativement déplacées entre les deux molécules.

D'après la littérature et les spectres que nous avons obtenus, on a seulement deux bandes de vibration qui peuvent différencier une adénosine d'une adénine. La première vibration caractéristique, dans la région des ν (C=C), est visible comme une bande fine à 1580 cm^{-1} pour l'adénosine uniquement. En effet, l'ajout d'un D-ribose sur le N9 stabilise la structure de la base purique et par la suite les vibrations correspondantes aux deux groupements C=C et C=N seront bien résolues. La deuxième est celle de ν N-9-C-1', c'est à dire de la liaison glycosidique (mise en évidence sur la structure de l'adénosine dans la figure 29). Elle apparaît effectivement comme une bande d'assez faible intensité à 1225 cm^{-1} pour l'adénosine massive, mais est masquée par l'absorption de la silice dans l'échantillon supporté, ce qui rend la détection directe de la bande caractéristique de la liaison N-glycosidique impossible. C'est pourquoi on a analysé la matière organique contenue dans ces échantillons par spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse est une technique puissante d'identification des molécules organiques, y compris dans des mélanges, mais elle ne peut pas être appliquée *in situ*: il faut passer par une étape de désorption afin de transférer les molécules supportées dans une solution aqueuse.

I.I Analyse MALDI

La solution de désorption de l'échantillon ribose + A / SiO₂ a été analysée en MALDI (ionisation positive). Le spectre obtenu est présenté dans la figure V-29, comparé à celui d'une solution de référence d'adénosine (partie A de la figure). Celui-ci montre un pic caractéristique "MH⁺" (c'est à dire correspondant à la molécule d'adénosine monoprotonnée, de formule C₁₀H₁₃N₅O₄.H⁺) à m/e = 268,10 uma (attendu 268,24). Une solution de référence d'adénine montre de même un pic caractéristique MH⁺ (C₅H₅N₅.H⁺) à m/e = 136,10 uma; quant au ribose, il n'est pas détectable dans ces conditions à cause de la difficulté à l'ioniser positivement.

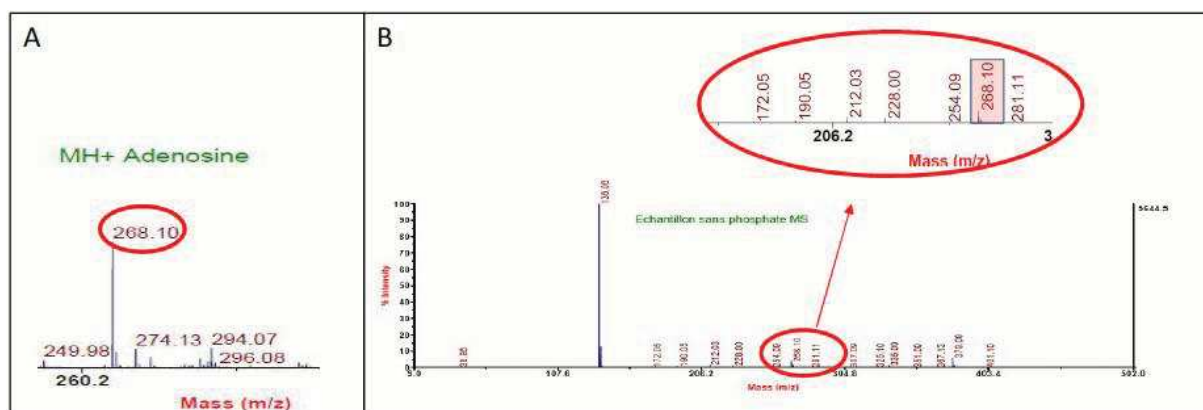


Figure V-29 : Analyse MALDI d'une solution de référence d'adénosine (A) et de ribose + A / SiO₂ séché à 70° (B).

La partie B présente le spectre de notre échantillon d'intérêt analysé après désorption de la surface de la silice. Ce spectre présente le pic de l'adénine comme il est attendu, mais aussi un pic moins intense à $m/e = 268,10$ uma. Ceci indique la glycosylation partielle de l'adénine par co-adsorption avec le D-ribose sur la surface de la silice après séchage à 70°C.

Nous avons tenté d'estimer le rendement de la glycosylation en comparant l'intensité relative des pics d'adénosine et d'adénine dans notre échantillon, à celle qu'on obtient sur des solutions de référence préparées à partir des substances pures. Le rendement ainsi calculé est de 4,1 %. Il est similaire à ce qui est observé sur une glycosylation « à sec »¹².

II. En présence du phosphate inorganique

D'après les travaux décrits dans les paragraphes précédents, on a réussi premièrement à phosphoryler le ribose avec un rendement de 10% sur la surface de la silice et deuxièmement, à le condenser avec l'adénine. Notre but ultime est la formation d'AMP, ce qui nécessite soit d'effectuer simultanément les deux réactions précédentes (phosphorylation et glycosylation) en une seule étape directe (co-adsorption des 3 composants) soit de procéder en deux étapes successives (phosphorylation puis glycosylation, ou l'inverse).

La première possibilité semble plus prometteuse. Selon le travail de Sponer 2011¹³, la phosphorylation préalable du sucre rend la réaction de glycosylation exergonique en raison de la présence d'un bon groupe partant, le diphosphate. Dans le but d'augmenter le rendement de la réaction de glycosylation et d'étudier la possibilité de formation directe d'AMP sur la surface de la silice, on a co-adsorbé le ribose, l'adénine et du phosphate inorganique sur la surface de la silice.

II.1 DRX

La figure V-30 présente les diffractogrammes de Rayons X des échantillons séchés à 70°C (C) et après activation thermique à 100°C/3h (D) de l'échantillon d'AR1P-SiO₂. Ces diffractogrammes sont superposés avec ceux du phosphate massique (A) et de l'adénine massique afin de savoir si on a une phase cristalline dans l'échantillon.

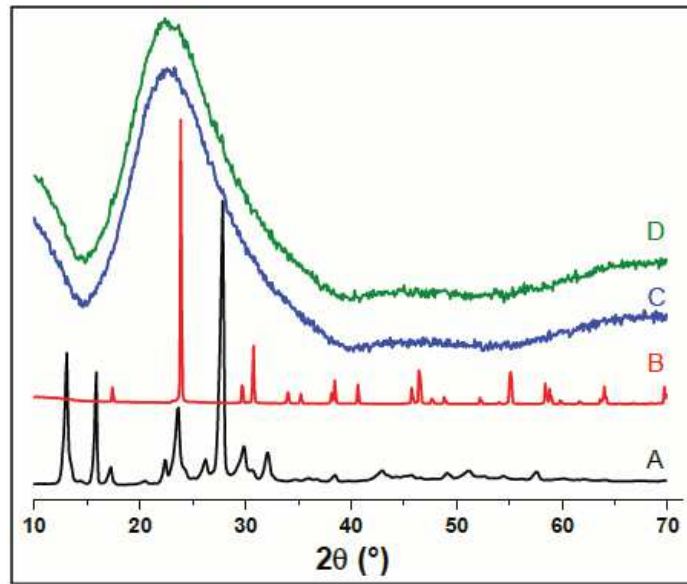


Figure V-30 : analyse DRX de KH_2PO_4 (A) ; adénine (B) ; AR1P / SiO_2 , Ta (C) et 100°C/3h (D).

Les diffractogrammes A et B montrent des pics fins et bien résolus pour les références correspondant aux phases cristallines de KH_2PO_4 et de l'adénine, respectivement. Celles-ci devraient donc être faciles à détecter si elles étaient présentes. Cependant, nos échantillons (C et D) présentent uniquement la bande large vers 23° 2θ caractéristique de la silice amorphe : les espèces phosphates et adénine introduites sont donc bien dispersées. D'autre part, on a analysé les deux phases de l'échantillon AR2P- SiO_2 et seulement la phase majoritaire pour l'échantillon contenant du ribose marqué (AR2P / $\text{SiO}_{2,m}$). La figure V-31 présente les diffractogrammes obtenus ainsi que ceux des références (KH_2PO_4 , adénine, AMP).

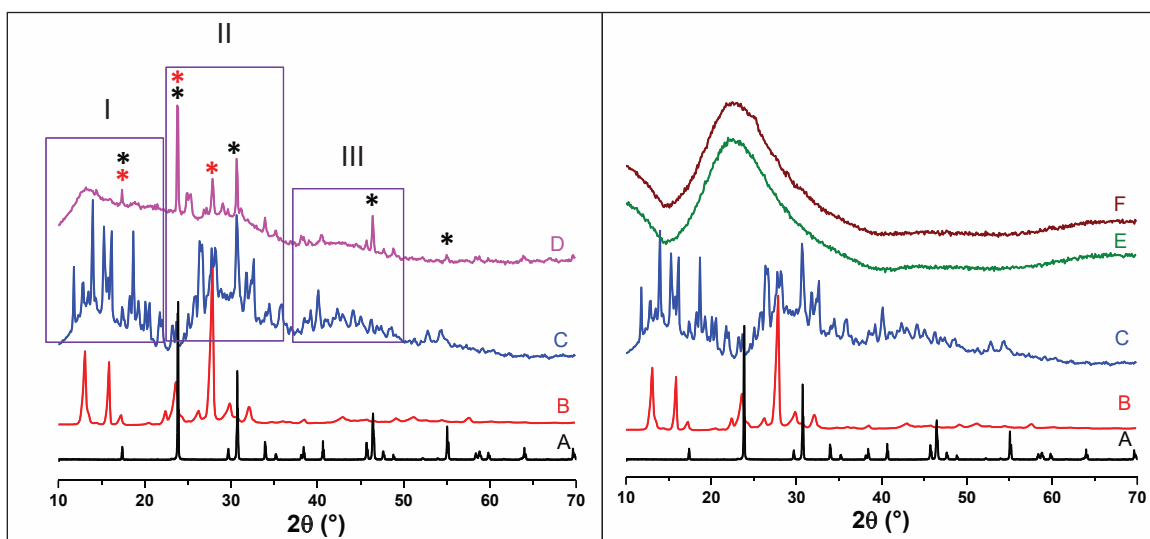


Figure V-31 : DRX de KH_2PO_4 (A) ; adénine (B) ; AMP (C) ; AR2P / $\text{SiO}_{2,p}$ (D), AR2P / $\text{SiO}_{2,m}$ (E) et AR*2P / $\text{SiO}_{2,m}$ (F).

La première partie de la figure IV-31 nous montre le diffractogramme de l'échantillon d'AR2P / SiO_{2, p} (D) superposé avec ceux des références. Le diffractogramme C montre une série de pics fins caractéristiques de l'AMP massique, de faible intensité (le diffractogramme est renormalisé) mais aussi trois pics larges qui sont indiqués sur la figure par les régions I, II et III. Il est possible que l'AMP puisse exister sous la forme de deux phases de cristallinité différente ; nous ne disposons pas d'informations sur ce point dans la bibliographie.

Revenant au diffractogramme d'AR2P / SiO_{2, p} (D), il présente des pics caractéristiques du phosphate massique (étoiles noires) et d'autres caractéristiques de l'adénine (étoiles rouges). Cela n'est pas étonnant si le précipité vient d'une solution contenant l'adénine et le phosphate résiduels introduits lors de la préparation de cet échantillon. Cependant, comme celui de l'AMP massique, ce diffractogramme renferme aussi trois pics larges qui apparaissent à peu près aux mêmes endroits. Bien sûr, cette observation ne peut pas être considérée à elle seule comme l'indication de la présence d'AMP massique, mais on pourra s'en souvenir lors de la discussion des résultats d'autres techniques de caractérisation.

La deuxième partie de la figure présente les diffractogrammes de la deuxième phase (majoritaire) des échantillons d'AR2P / SiO_{2, m} (E) et d'AR*2P / SiO_{2, m} (F). Aucune phase cristalline n'est détectée avec ces deux échantillons. On voit seulement apparaître le pic caractéristique de la silice amorphe. Ces observations sont compréhensibles si la phase majoritaire consiste en silice sur laquelle sont adsorbées des espèces moléculaires bien dispersées.

II.II Analyse FTIR

Deux échantillons d'ARP / SiO₂ ont été analysés par FTIR. Le premier est celui préparé avec un équivalent molaire de phosphates (AR1P-SiO₂), tandis que le deuxième contient une quantité double de phosphate (AR2P-SiO₂). Les spectres obtenus sont présentés dans la figure IV-32, B et C, respectivement. L'échantillon AMP / SiO₂ a été analysé dans les mêmes conditions et est présenté en tant que référence dans la même figure, spectre A.

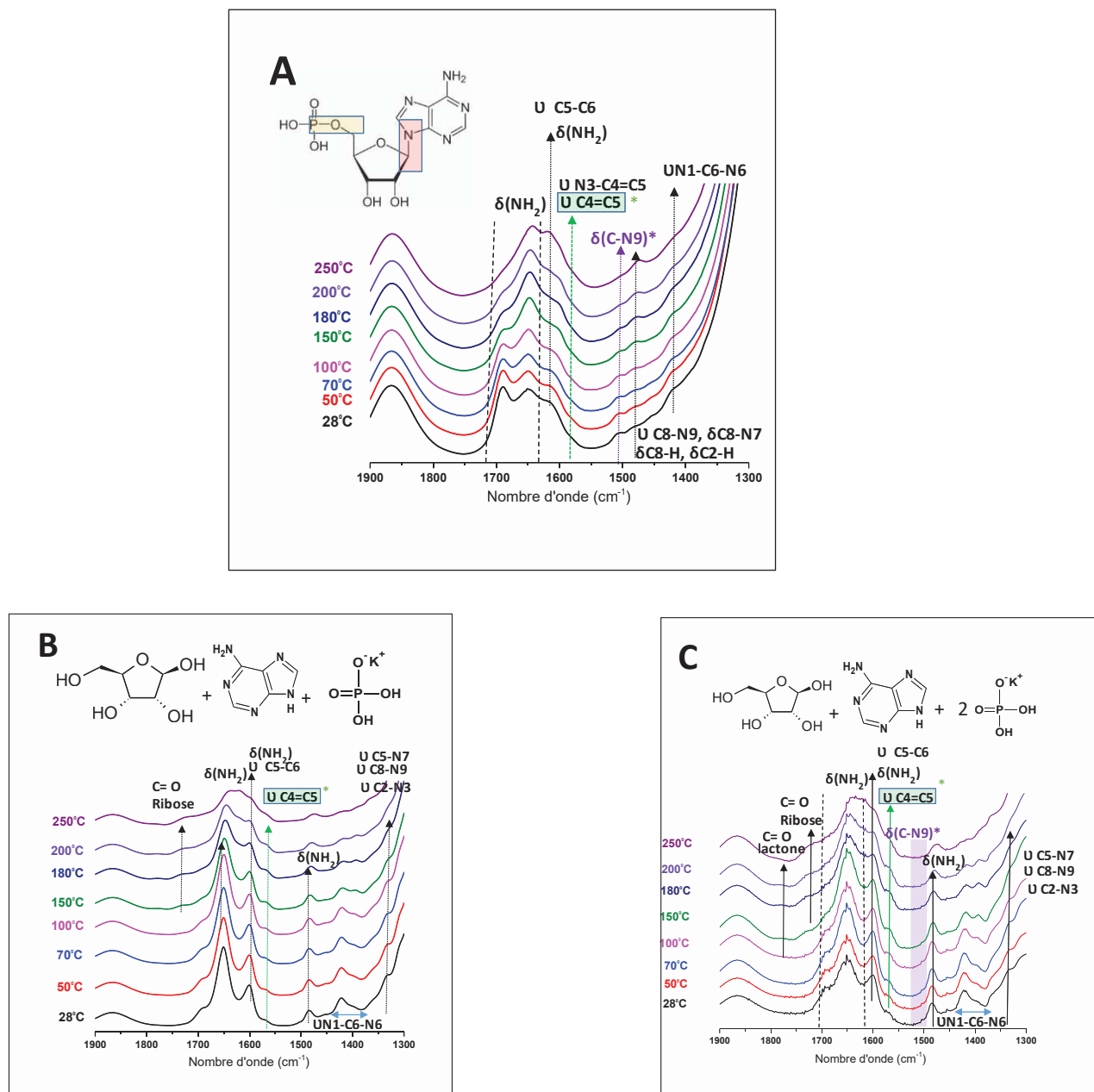


Figure V-32 : analyse FTIR d'AMP / SiO₂ (A), AR1P-SiO₂ (B) et AR2P-SiO₂ (C).

Les spectres d'AMP-SiO₂ présentent une bande de vibration dans la région des δ_{NH} , à 1689 cm⁻¹. Cette bande est caractéristique de groupements -NH₃⁺. Une autre bande caractéristique de la glycosylation attendue serait la ν C4=C5, mais cette bande se réduit à un épaulement large et peu discernable dans nos spectres. D'autre part, on observe une nouvelle bande à 1505 cm⁻¹ qui d'après la bibliographie correspond à la vibration δ (C-N9-H). Cependant, on n'a pas observé cette bande dans le spectre d'adénine-SiO₂.

En considérant les spectres de nos échantillons obtenus par coadsorption d'adénine, ribose et phosphates, on peut faire plusieurs remarques intéressantes. Premièrement, on observe à partir de 150°C certaines des transformations du ribose que nous avons mises en évidence au Chapitre 3: une bande caractéristique du ribose linéaire vers 1720 cm^{-1} dans les deux spectres B et C et, pour le spectre C uniquement, une bande vers 1760 cm^{-1} qu'on peut sans doute attribuer à un ribonolactone.

Deuxièmement, la bande (C4=C5) caractéristique de la molécule glycosylée semble présente dans les deux échantillons vers 1570 cm^{-1} . En chauffant, cette bande devient de mieux en mieux résolue et séparable des autres bandes, surtout à partir de 100°C. Elle est mieux individualisée avec l'AR2P / SiO_2 qu'avec l'AR1P / SiO_2 . Elle constitue un indice de glycosylation solide mais qui devrait être confirmé par d'autres techniques.

II.III Analyse RMN :

i. RMN de ^{31}P (1 pulse), échantillon AR1P / SiO_2

D'abord, on a analysé l'échantillon d'AMP / SiO_2 afin de déterminer où attendre le signal du phosphore de l'AMP adsorbé. Ensuite, nous avons analysé l'échantillon d'AR1P / SiO_2 à 70°C et à 100°C pendant 3h. Les spectres obtenus sont présentés dans la figure V-33 avec ceux du phosphate massique avant (A) et après adsorption sur la surface de silice à Ta (B) et après activation thermique (130°C/3h), (C).

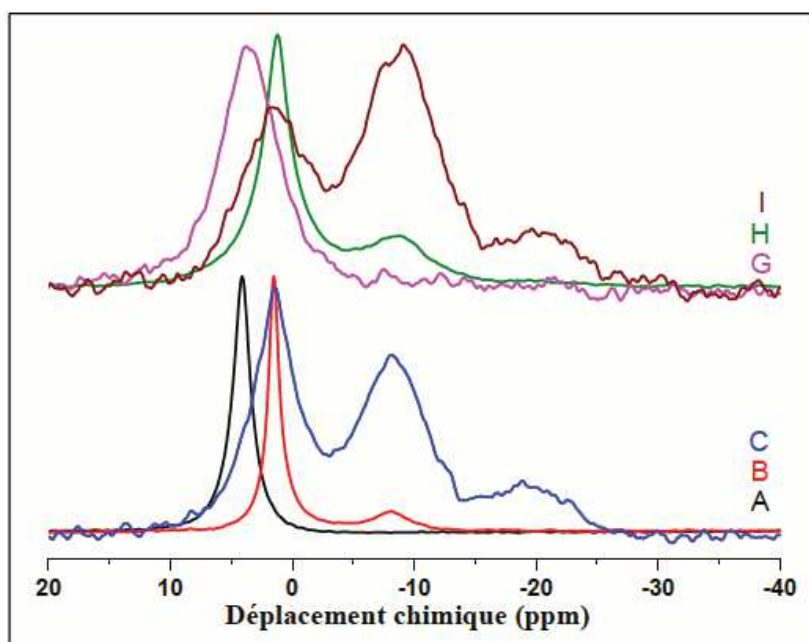


Figure V-33 : ^{31}P RMN de KH_2PO_4 (A) ; 10% Pi / SiO_2 à 70°C (B) et 130°C (C) ; 5% AMP / SiO_2 (G) ; AR1P / SiO_2 à 70°C (H) et 100°C (I).

Les spectres A, B et C ont été discutés dans la partie précédente (partie B). Le spectre G, celui de l'AMP / SiO₂, semble présenter un pic unique centré à 3,85 ppm. Pour AR1P / SiO₂ avant activation thermique (H), on observe deux pics dans la région de Q⁰ et Q¹, plus larges que ceux observés dans le spectre de Pi / SiO₂ (B). Après activation thermique, on remarque l'apparition d'un troisième environnement de phosphore dans la région des Q². En même temps, les pics de Q⁰ et Q¹ deviennent plus larges que ceux observés à Ta.

Les décompositions (Figure V-34) permettent de préciser ces observations.

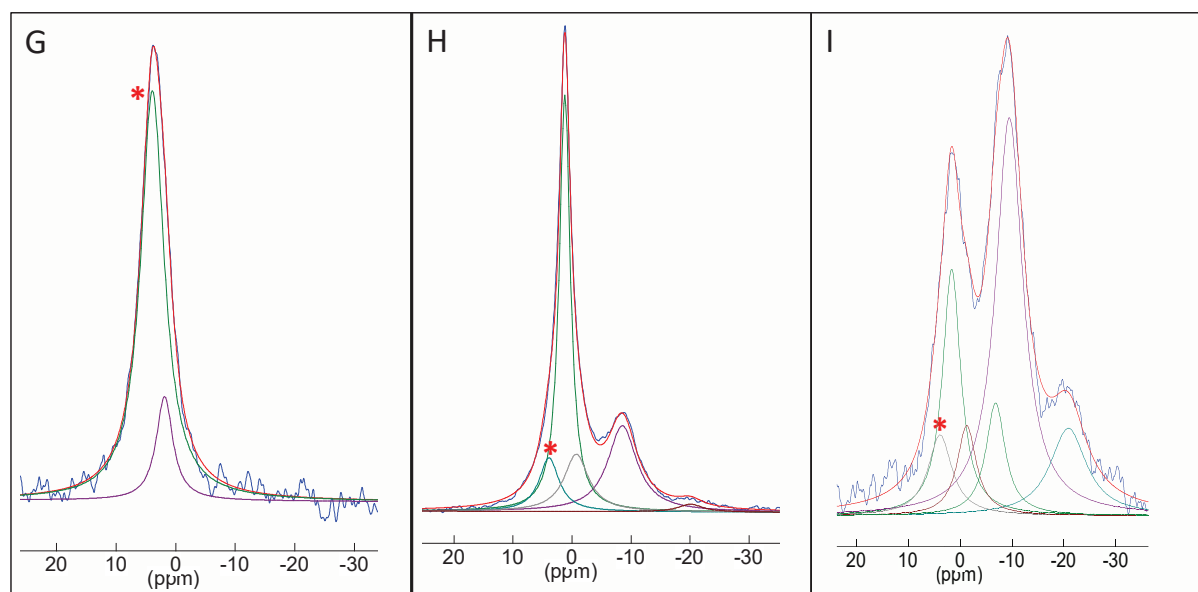


Figure V-34 : Les décompositions des spectres de ³¹P, 1 pulse RMN d'AMP / SiO₂ (G) ; AR1P / SiO₂, après séchage à 70°C (H) et 100°C/3h (I).

Le spectre d'AMP / SiO₂ (G) présente un pic principal à 3,91 ppm (pourcentage relatif par rapport au total du phosphore = 85%), caractéristique du phosphore Q⁰ (1C) de l'AMP, et un petit pic à 1,8 ppm (15% du total de phosphore). Celui-ci correspond sans doute à du monophosphate venant de l'hydrolyse partielle de l'AMP. En effet, si la silice est capable de catalyser la phosphorylation, elle aussi forcément capable de catalyser la réaction inverse de déphosphorylation (principe de microréversibilité).

Le spectre de l'échantillon AR1P / SiO₂ présente un pic principal à 1,2 ppm (% relatif par rapport au phosphore total = 47%) qui peut correspondre au monophosphate adsorbé. Deux autres environnements sont aussi présents dans la région de Q⁰, le premier à 3,9 ppm (% relatif = 10,8%), le deuxième à -0,72 ppm (% relatif = 14%). Le pic à 3,9 ppm pourrait visiblement être dû à la présence d'AMP dans notre échantillon : comme en DRX aucun

précipité n'est détecté, il s'agirait d'AMP supporté. Le second pic n'existe pas dans le spectre de Pi / SiO₂ ni dans celui de R1P / SiO₂. Il semble logique de proposer qu'il soit lui aussi lié à une espèce dérivée de l'adénine.

Le spectre I présente l'analyse effectuée après activation thermique 100C /3h. On observe 3 environnements Q⁰ à 3,9 ppm (7,9 %), 1,6 ppm (18,3%) et -1,2 ppm (7 %). Le premier pic est celui que nous avons attribué à l'AMP, on remarque que son pourcentage diminue avec le chauffage. Donc, au contraire de la réaction de phosphorylation, cette réaction a un rendement moins élevé à haute température qu'à Ta. La largeur à mi-hauteur de ce pic augmente (de 4 à 5,56 ppm) ce qui indique que les molécules deviennent moins mobiles, un fait sans doute corrélé avec la quantité d'eau moins élevée. Le pic attribué au monophosphate adsorbé se déplace légèrement, de 1,2 à 1,6 ppm, son pourcentage relatif diminue de 47 à 18% alors que sa largeur à mi-hauteur augmente de 2,2 à 4,2 ppm. L'activation thermique provoque certainement la condensation du monophosphate. Le dernier pic dans la région des Q⁰ se déplace aussi de -0,7 à -1,2 ppm en conservant presque la même mobilité (lmh¹ = 5 ppm). Son pourcentage relatif diminue de moitié, de 14 à 7%. Tout comme pour l'AMP, la présence de ce composé n'est pas favorisée par une activation à plus haute température. D'autre part, on voit apparaître un nouvel environnement de Q¹ non attribué pour l'instant : la quantification nous montre la présence d'un pic à -9,4 ppm (44,5%) et d'un autre à -6,8 ppm (9%). Ces deux espèces sont peu mobiles et la quantité de Q¹ a considérablement augmenté. Il en va de même pour celle de Q² puisque le pic à -20 ppm représente 13% du phosphore total. De même, cet environnement devient moins mobile après chauffage.

ii. RMN de ³¹P (1 pulse et CP) d'AR*2P / SiO₂ (précipité et fraction majoritaire)

Comme indiqué ci-dessus, l'échantillon préparé à partir du ribose marqué (5 ¹³C) à été analysé par RMN de ³¹P (1 pulse, CP MAS) après séparation des deux phases. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure V-35.

¹ lmh : largeur à mi-hauteur

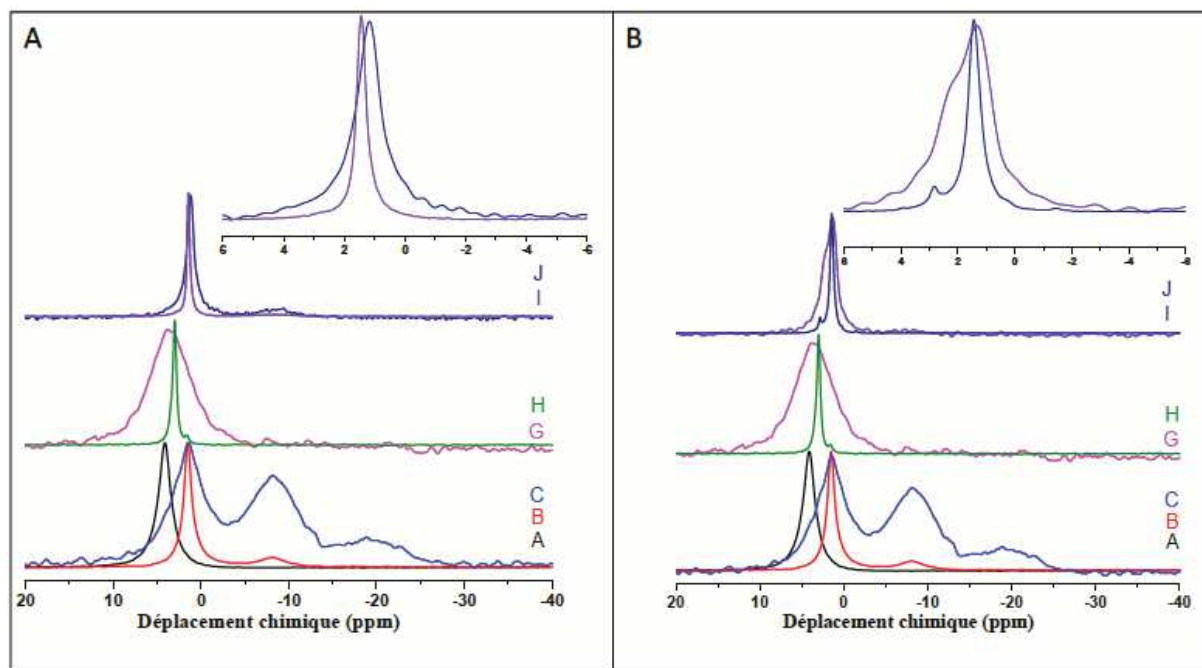


Figure V-35 : ^{31}P 1pulse de KH_2PO_4 (A) ; Pi-SiO_2 à Ta (B) et 130°C (C), 5% AMP- SiO_2 (G) ; R5'P (H),
 Partie gauche: fraction majoritaire, RMN CP-MAS d'AR*2PSiO_{2m} (I) et ^{31}P 1pulse du même échantillon (J)
 Partie droite: précipité, RMN CP-MAS d'AR*2PSiO_{2p} (I) et ^{31}P 1pulse du même échantillon (J)

Les spectres A, B, C, G et H représentent les références habituelles en ^{31}P , 1 pulse (leurs spectres en CP ont déjà été présentés dans la partie B-II).

Les spectres notés I et représentés en violet correspondent aux analyses 1 pulse sur la fraction majoritaire et celle du précipité, respectivement. Ces spectres présentent des signaux du phosphore dans la région Q^0 . Pourtant, ils ne présentent pas le même profil. Dans le spectre de gauche (fraction majoritaire), le pic de Q^0 est centré à 1,4 ppm et il est large à la base alors que dans le spectre de droite (précipité), ce pic est plus large, il est centré à 1,3 ppm et renferme deux épaulements, le premier vers 2 ppm et le deuxième vers 3 ppm.

L'analyse CP-MAS de ces échantillons (spectres notés J, en bleu foncé) montre la présence de deux environnements protonés, un Q^0 et un Q^1 . Plus précisément, le spectre de gauche (fraction majoritaire) présente un pic principal de Q^0 centré à 1,1 ppm. Il est à la fois plus large et décalé par rapport au spectre correspondant en 1-pulse. Le pic de Q^1 est très petit et large. Le spectre de droite (précipité) présente un pic principal à 1,4 ppm et un deuxième pic moins intense à 2,8 ppm avec des épaulements à 3,9 ; 0,4 ; -1,4 ppm. En comparant ce spectre avec son équivalent 1 pulse, on trouve que tous ces pics pourraient être présents mais mal résolus dans le large pic 1 pulse. Les décompositions sont présentées ci-dessous.

La figure V-36 présente les décompositions des spectres 1 pulse (A) et CP (B) de l'échantillon d'AR*2P / SiO_{2,m}.

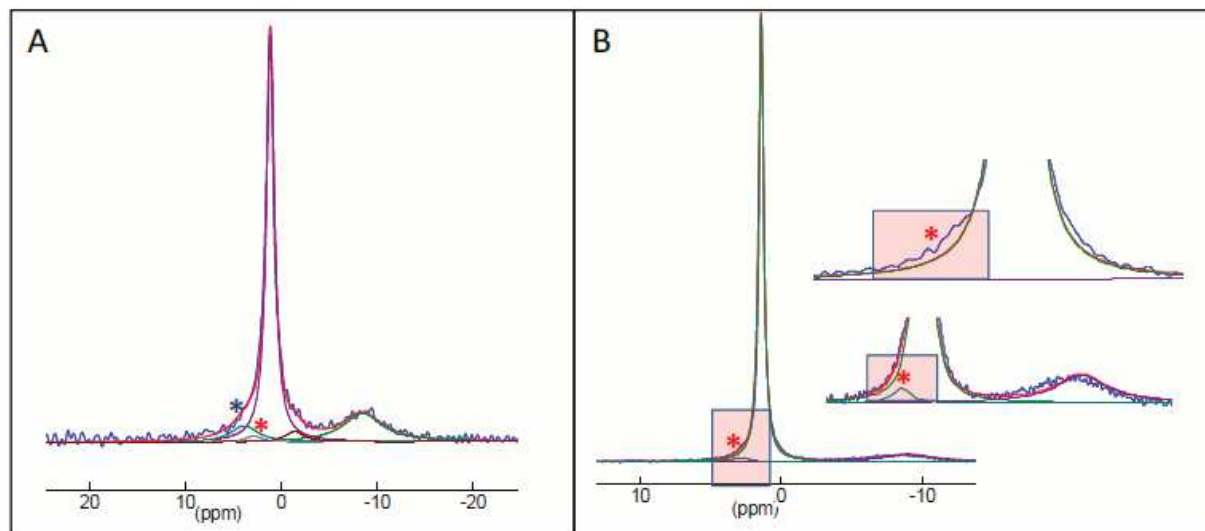


Figure V-36 : les décompositions des spectres RMN de ³¹P 1 pulse (A) et CP-MAS (B) d'AR*2P / SiO_{2,m}.

Le spectre 1-pulse montre la présence de quatre environnements de Q⁰ et d'un seul environnement de Q¹. Nous avons d'abord décomposé la région de Q⁰ en trois pics seulement, mais comme le spectre CP comporte une composante à 2,85 ppm (partie B de la figure IV-36 ; cette composante est indiquée par une étoile rouge), nous l'avons aussi incluse dans la décomposition du spectre 1-pulse. Ce pic est pratiquement à la même position que celui de notre référence R5'P. Rappelons que dans la partie II, on a attribué ce pic aux phosphates en position 5' dans le PRPP car il possédait la même mobilité et le même pourcentage relatif en phosphore qu'un pic qui sort dans la région de Q¹. Cependant, dans les échantillons ARP/SiO₂, on n'observe aucune relation entre le pic à 2,9 ppm et un pic q dans la région de Q¹, ce qui indique que le produit formé est plutôt le R5'P. Notons que la composante vers 3,9 ppm (AMP) n'apparaît pas dans la décomposition du spectre CP-MAS alors qu'elle est nécessaire pour un bon fit dans celle du spectre 1-pulse. Cela est probablement lié au fait que le phosphate de l'AMP n'est pas protoné. En revanche, les pics attribués au monophosphate adsorbé et au phosphate condensé dans la région Q¹ doivent être protonés puisqu'ils apparaissent en CP.

La décomposition du spectre 1 pulse montre un pourcentage relatif de 8,6% d'AMP et 1,8% de R5'P. On aurait donc une phosphorylation sans glycosylation, minoritaire, et une phosphorylation accompagnée de glycosylation, majoritaire. A noter que la quantité totale, d'environ 10%, est du même ordre que la quantité de PRPP qui était formée dans les échantillons R1P / SiO₂ correspondants. Cette observation serait compatible avec un

mécanisme où le PRPP se forme d'abord, puis réagit principalement avec la nucléobase pour la glycosyler.

La figure V-37 montre les décompositions des signaux 1-pulse et CP de la fraction précipitée collectée sur les parois du bécher, AR2P / SiO_{2,p}.

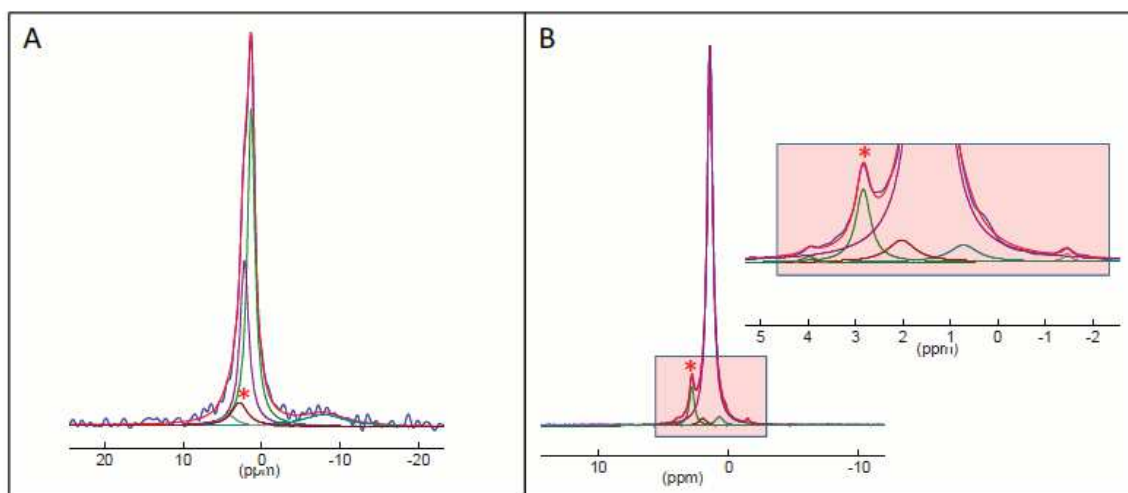


Figure V-37 : les décompositions des spectres RMN de ³¹P RMN 1 pulse (A) et CP MAS (B) d'AR2P / SiO_{2,p}

Le signal 1-pulse dans la région Q⁰ est manifestement composite. Comme dans le cas précédent, nous nous sommes aidés des singularités bien résolues du signal CP pour déterminer le nombre et la position des composantes de la décomposition. La région Q⁰ comporte 4 pics. Les deux pics principaux à 1,3 ppm et 2,1 ppm (épaulement) sont à des positions que nous attribuons généralement à des formes différentes de monophosphate massique. Reste à savoir s'il s'agit de monophosphate adsorbé sur la silice, puisque la présence de celle-ci dans la "fraction précipitée" n'est pas avérée.

La composante à 2,8 ppm (étoile rouge) est sans doute du R5'P (cf. supra) et correspond à 7,6 % du phosphore total. Le quatrième pic existant dans la région de Q⁰ se trouve à 4,20 ppm. Il est caractéristique du phosphate KH₂PO₄ massique. Sa présence est confirmée par la DRX qui indique l'existence de cette phase cristalline, et par la CP MAS qui présente un petit pic à 3,9 ppm. En comparant les deux analyses, on remarque que le pic à 1,4 ppm est beaucoup plus intense en 1-pulse qu'en CP : avec ce dernier mode de détection, le signal à 2,1 ppm prédomine de beaucoup. Le pic à 2,8 ppm attribué à R5'P est particulièrement bien résolu et lève tout doute sur la présence de cette espèce. On distingue encore en CP deux pics très mineurs à 0,7 et -1,4 ppm, mais vu leur faible contribution et leur absence en 1-pulse, nous ne tenterons pas de les identifier.

Il est intéressant d'observer du R5'P dans une fraction qui semble avoir précipité indépendamment de la surface. La phosphorylation pourrait donc avoir lieu déjà dans une

solution concentrée, sans doute avec un effet catalytique de la surface, mais sans que celle-ci retienne adsorbés les produits de phosphorylation. Une contribution faible à 3,9 ppm, dans la région de l'AMP, semble nécessaire pour fitter le spectre 1-pulse. Ce signal répond faiblement en CP, ce qui est aussi le cas de la référence AMP. Il pourrait constituer un indice de glycosylation (accompagnée de phosphorylation), mais cet indice est trop faible pour emporter la conviction à lui seul car il est difficile de discriminer ce signal de celui du précipité KH_2PO_4 . Il devra être confirmé par d'autres techniques. Quant à la glycosylation sans phosphorylation, elle serait bien entendu indétectable par RMN de ^{31}P .

Les spectres RMN permettent aussi une observation négative, mais qui n'en est pas moins intéressante. On n'observe pas de PRPP, contrairement aux échantillons contenant uniquement ribose et phosphate. Cela signifie que la présence d'adénine interfère de façon significative dans les transformations chimiques du ribose.

iii. RMN CP de ^{13}C d'AR*2P / SiO_2 (précipité, et fraction majoritaire)

Nous pensions a priori que la RMN du ^{13}C , technique sensible à l'environnement atomique, permettrait de discriminer les signaux éventuels des carbones de l'adénine et/ou de l'AMP, ou en tout cas ceux des carbones les plus fortement influencés par la glycosylation. Pour identifier ceux-ci, nous avons enregistré en solution aqueuse les spectres des molécules de référence (Tableau V-13). On constate tout d'abord que ces spectres sont nettement plus simples que ceux du ribose, ce qui n'est pas étonnant car seul l'isomère β_f est présent.

Les positions des pics de l'adénosine sont en accord avec les données publiées par Gasowska¹⁴, à part une interversion probable des pics C2 et C3. La glycosylation cause comme on s'y attendait un déplacement important du pic C1, de -12,65 ppm. Mais des déplacements significatifs sont aussi induits pour C2, C4 et même C5.

Tableau V-13 : positions des pics de RMN de ^{13}C pour l'isomère β_f , comparaison du ribose, de l'adénine (nos données, et celles de la littérature), et de l'AMP.

Pic	δ dans le ribose	δ dans l'adénosine	δ dans l'adénosine (Gasowska)	δ dans l'AMP
β_f , C1	100,9	88,35	88,23	86,88
β_f , C2	75,15	73,68	70,51	74,48
β_f , C3	70,4	70,72	73,65	70,60
β_f , C4	82,4	85,88	85,67	84,52
β_f , C5	62,45	61,60	61,46	63,34

Dans l'AMP, par rapport à l'adénosine, la phosphorylation du carbone 5' cause des déplacements de qqz ppm des pics de la partie "ribose". De façon inattendue, l'effet sur le carbone qui porte le groupe phosphate (le C5') n'est pas tellement plus important que sur les autres. Les 5 résonances des carbones de la nucléobase sont aussi apparents, mais dans une région du spectre complètement séparée (entre 118 et 155 ppm).

La figure V-38 compare les spectres RMN CP-MAS de ^{13}C de nos échantillons solides avec ceux de ribose / SiO_2 (non marqué), (A).

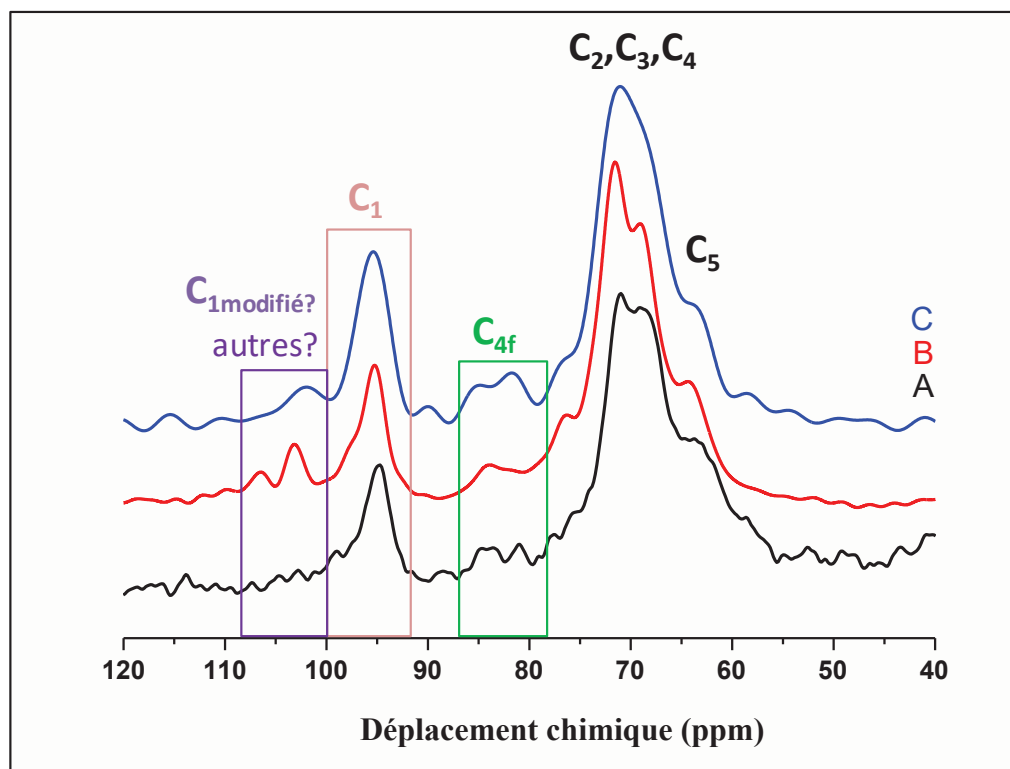


Figure V-38 : RMN CP MAS de ^{13}C de 10%Ribose / SiO_2 (A, noir) ; $\text{AR}^*2\text{P} / \text{SiO}_{2,p}$ (B, rouge) et $\text{AR}^*2\text{P} / \text{SiO}_{2,m}$ (C, bleu)

Les spectres B et C sont ceux des échantillons $\text{AR}_m2\text{PSiO}_{2p}$ et $\text{AR}_m2\text{PSiO}_{2m}$, respectivement. Par rapport à l'échantillon Ribose/ SiO_2 , les spectres sont globalement assez semblables, avec des signaux supplémentaires notamment vers 75 ppm, dans la région 80-90 ppm et dans la région 100-110 ppm. Des tentatives de décomposition sont présentées à la Figure V-39, mais les spectres sont assez bruités et elles doivent être considérées comme très hypothétiques.

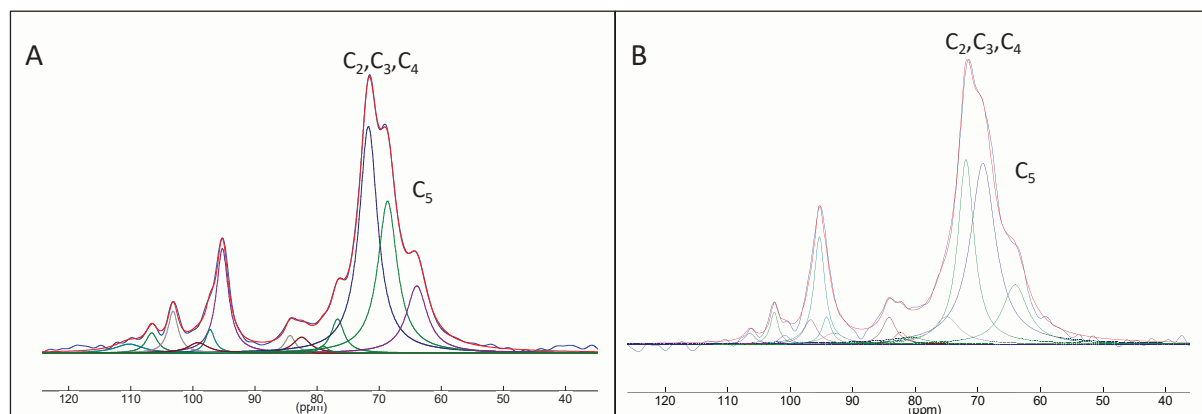


Figure V-39 : Décompositions des spectres RMN CP-MAS de ^{13}C d'AR*2P / SiO_2, p (A) et d'AR*2P / SiO_2, m (B).

Une composante à 84,4 ppm correspond à peu près à la position du C4 de l'AMP, mais nous avons observé précédemment que la forme α_f du ribose lui-même peut résonner presque aussi haut lorsqu'il est déposé à la surface de la silice¹¹. Quant au pic vers 88 ppm (C1) qui devrait être le plus typique des nucléosides/nucléotides par rapport au ribose, il est possible qu'on observe un faible signal dans cette région pour l'échantillon "fraction majoritaire", mais cela reste à confirmer.

Nous avons tenté de dissoudre la matière organique contenue dans la fraction "précipité" dans une solution de D_2O pour la soumettre à une analyse par RMN du liquide de ^{13}C . Le spectre obtenu est difficile à interpréter à cause notamment des nombreux éclatements dus aux couplages J entre carbones-13 voisins. Il aurait été préférable d'utiliser un ribose marqué uniquement sur la position C1, mais ce produit n'était pas disponible commercialement.

A l'inverse, on observe entre 100 et 110 ppm plusieurs pics, surtout visibles pour la fraction "précipité", qui ne correspondent certainement pas à l'adénosine ni à l'AMP. Ils ressemblent plutôt aux pics que nous avons attribués aux formes anomériques du PRPP au § D.I. Toutefois, dans le cas présent, les signaux de PRPP n'étaient pas apparents en RMN du ^{31}P : il y a donc là une incohérence qu'il faudrait résoudre. Rappelons qu'un des signaux de RMN du ^{31}P suggérait une molécule phosphorylée en une autre position que le 5' : cette espèce inconnue est-elle aussi responsable des signaux du ^{13}C entre 100 et 110 ppm ?

II.IV Analyse MALDI

Nous considérons d'abord les références constituées de solutions aqueuses d'adénine, adénosine et AMP analysées en MALDI en mode positif. Les résultats sont présentés dans la figure V-40.

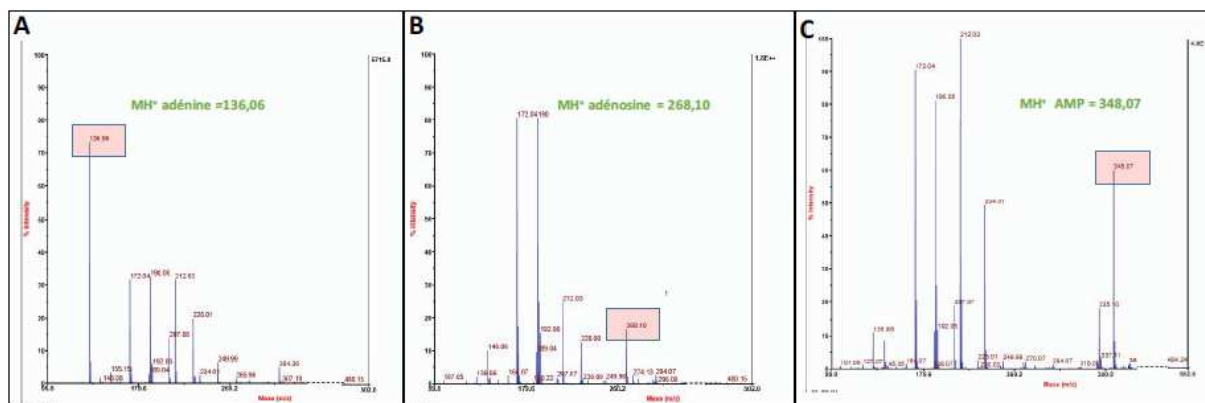


Figure V-40: MALDI en mode positif de l'adénine (A), de l'adénosine (B) et de l'AMP (C)

Les trois références sont observables en mode positif, avec un pic "MH⁺" correspondant à une simple protonation. L'adénine est détectée pour un rapport m/z de 136,06 (C₅H₅N₅ - H⁺) tandis que l'adénosine est observée à 268,10 (C₁₀H₁₃N₅O₄ - H⁺) et l'AMP à 348,07 : cette dernière valeur correspond à une formule C₁₀H₁₄N₅O₇P - H⁺, c'est à dire au groupe phosphate sous forme pleinement protonée, avec un proton supplémentaire fixé sans doute sur la nucléobase.

Ensuite, on a préparé un échantillon d'AR2P / SiO₂ et on l'a soumis à désorption directement sans séparation de phase. La figure V-41 montre le résultat observé.

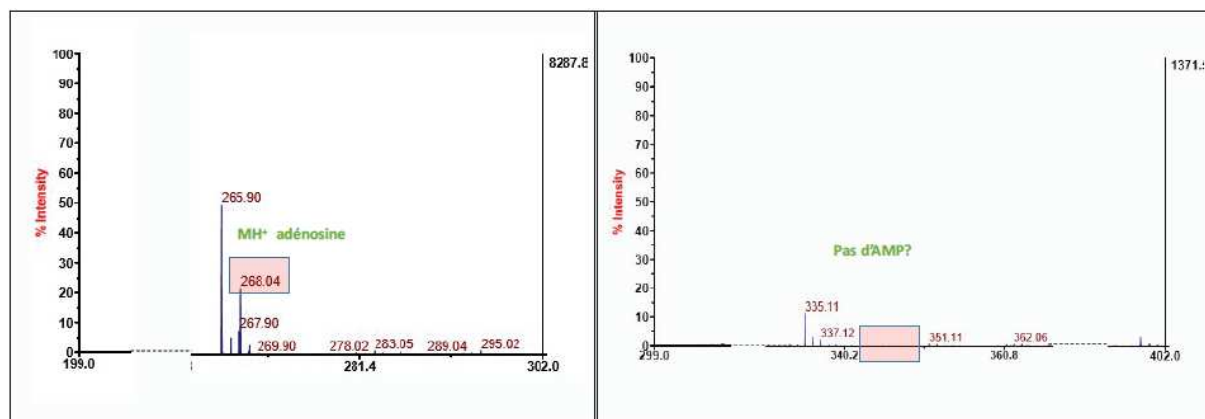


Figure V-41 : analyse MALDI en mode positif d'AR2P / SiO₂

Le spectre montre la présence d'un pic assez intense d'adénosine. Cependant, aucun pic caractéristique d'AMP n'est détecté.

Dans un second temps, on a re-préparé le même échantillon mais cette fois avec du ribose marqué. Ensuite on a séparé les deux phases (précipité, majoritaire) et on les a analysées séparément. La figure IV-42 montre les deux spectres d'AR*2P / SiO_{2, p} (partie A)

et d'AR*2P / SiO_{2, m} (partie B). Plus précisément, la fraction "précipité" a été solubilisée dans du D₂O avant analyse (Figure V-42).

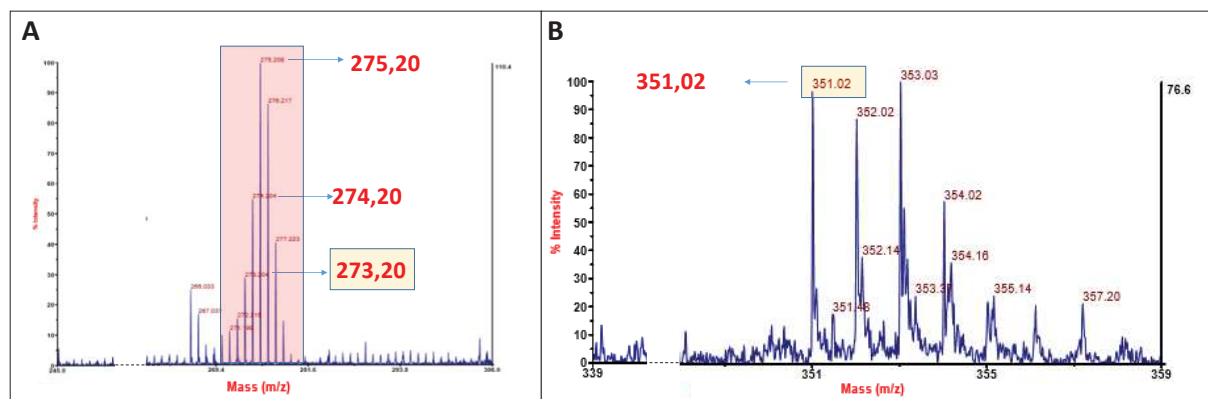


Figure V-42 : analyse MALDI en mode positif (A) et mode négatif (B) d'AR*2P / SiO_{2, p}

La partie A présente la région (245-305 uma) du spectre obtenu. Dans cette partie on observe un pic à $m/z = 273,20$ uma, soit à la position attendue pour l'adénosine formée à partir du ribose complètement marqué : la formule correspondante serait $(^{12}\text{C})_5(^{13}\text{C})_5\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4 - \text{H}^+$, avec cinq ^{13}C qui ne peuvent provenir que du ribose marqué isotopiquement introduit au départ. En même temps, on observe plusieurs autres pics plus ou moins intenses et qui apparaissent à $m/z+1, +2, +3, +4$ et $+5$. Etant donné qu'on a travaillé en solution dans D₂O, il s'agit certainement de produits de deutération partielle (où 1 à 5 atomes d'hydrogène sont remplacés par des deutériums) de la molécule correspondant au pic de base à $m/z = 273,20$ uma.

L'analyse en mode négatif ne présente aucun pic caractéristique d'adénosine. En revanche (spectre B), elle présente un pic vers 351,02 à la position attendue pour un ion AMP⁻ marqué par 5 ^{13}C (formule $(^{12}\text{C})_5(^{13}\text{C})_5\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}^-$).

Dans une dernière étape, on a analysé séparément deux solutions contenant les deux phases « précipitée et majoritaire » de l'échantillon d'AR2P / SiO₂. En effet, notre but était de concentrer les produits de la réaction. Pour cela, on a d'abord préparé un échantillon d'AR2P/SiO₂ en grande quantité. Ensuite, on a séparé les deux phases obtenues. Le précipité a été solubilisé et analysé directement en MALDI. Cependant, la phase majoritaire a subi une désorption puis une lyophilisation de la solution de désorption. La poudre obtenue a été solubilisée dans la moindre quantité d'eau et analysé en MALDI.

Ces analyses ont été effectuées en mode positif et mode négatif. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure V-43.

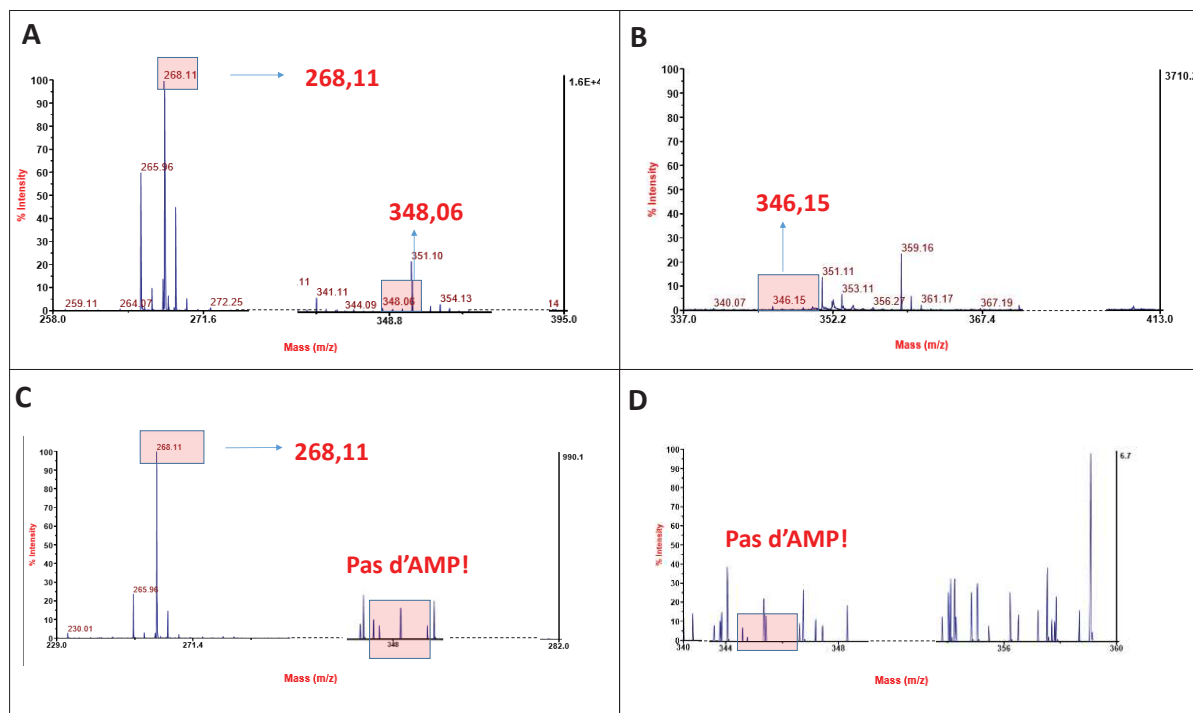


Figure V-43 : analyse MALDI de la fraction "précipité" en mode positif (A) et négatif (B) et de la fraction "majoritaire" en mode positif (C) et négatif (D)

L'analyse en mode positif des deux fractions indique la présence de l'adénosine ($C_{10}H_{13}N_5O_4 - H^+$) à partir de son pic caractéristique qui apparaît dans les deux spectres (A et C) à $m/z=268,11$ uma. En plus de l'adénosine, la fraction précipitée contient aussi de l'AMP. Celle-ci est détecté à partir de ces pics caractéristiques qui apparaissent respectivement à $m/z=348,06$ en mode positif ($C_{10}H_{14}N_5O_7P - H^+$) et à $346,14$ uma en mode négatif ($C_5H_{13}N_5O_7P^-$). Cependant, on n'a pas observé de pics caractéristiques d'AMP dans la fraction majoritaire.

II.V Discussion

Les expériences décrites dans ce paragraphe avaient pour but d'étudier la réactivité du ribose avec l'adénine en surface de la silice. Il semble clair que la glycosylation est possible et peut aboutir à l'adénosine, ou même selon les cas à l'AMP lorsque du monophosphate est initialement présent. Cela est clair d'après les résultats de spectrométrie de masse, qui montrent l'existence de ces molécules après un simple séchage à $70^\circ C$. La RMN de ^{31}P semble confirmer la formation d'AMP à partir du ribose dans l'échantillon enrichi en ^{13}C . Les

données IR et RMN de ^{13}C sont plus ambiguës, mais compatibles avec un taux significatif de glycosylation.

Le tableau (V- 14) présente les rendements approximatifs obtenus avec les différents échantillons, calculés par spectrométrie de masse.

Tableau V-14 : %age relatif en adénosine par rapport à la quantité totale d'adénine.

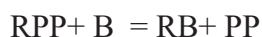
Echantillon	% relatif en adénosine/ adénine total
AR2P/SiO ₂	18,8
AR*2P / SiO _{2, p}	15,8
AR2P / SiO _{2, m}	21,4
AR2P / SiO _{2, p}	57,14

La comparaison quantitative avec la RMN (1-pulse), quand elle est possible (c'est à dire pour l'AMP, car seuls les spectres 1-pulse de ^{31}P sont utilisables) est difficile mais les ordres de grandeur semblent comparables. L'adénosine est observée dans les échantillons préparés en absence du phosphate avec un rendement de 3%. Cependant, en présence de phosphate, le rendement de la glycosylation augmente significativement jusqu'à 21%, ce qui est considérable pour une synthèse prébiotique.

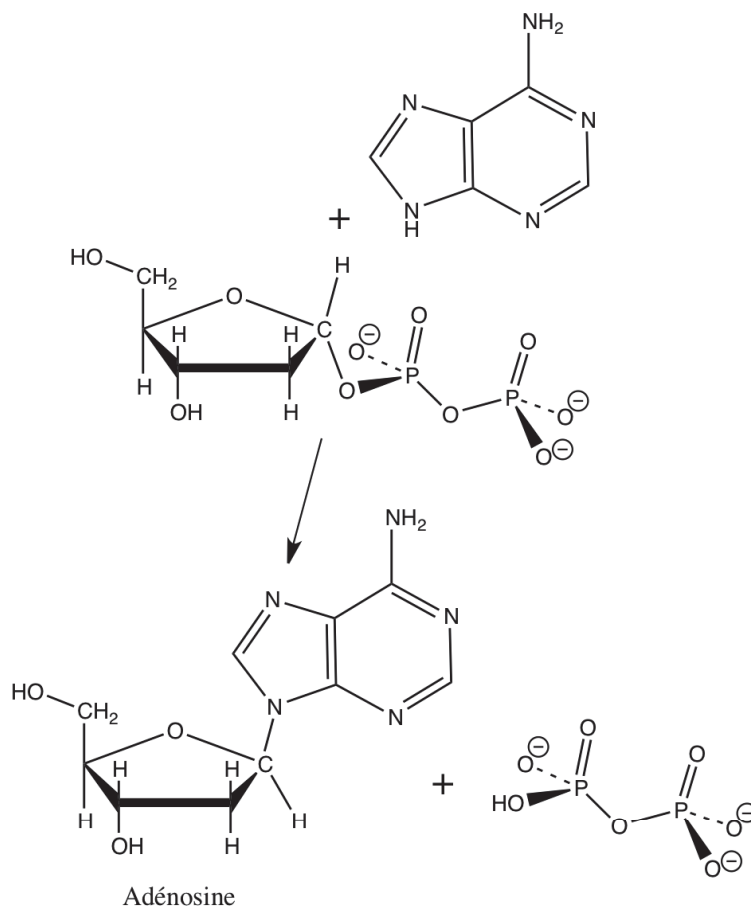
Les deux fractions de l'échantillon présentent la même composition. Notamment, on observe clairement l'adénosine dans la fraction "précipité" ce qui indique qu'après formation, sans doute sur la surface de la silice, la molécule a quitté la surface (désorption). Cette remarque est importante parce qu'elle répond à une objection fréquemment formulée contre les scénarios prébiotiques aux interfaces. Cette objection, formulée par De Duve et Miller¹⁵, est que des molécules prébiotiquement intéressantes peuvent peut-être se former sur des surfaces minérales parce que la thermodynamique de leur formation est plus favorable qu'en solution; mais dans ce cas, cela signifie que ces molécules sont stabilisées à l'état adsorbé, et donc qu'elles ne pourront pas désorber et être mobilisées en solution aqueuse, ce qui semble indispensable pour la suite de l'évolution de la complexité. Nous voyons qu'il n'en est rien pour l'adénosine et l'AMP formées en surface de silice.

On peut ensuite se demander pourquoi le rendement de la glycosylation (une réaction entre le ribose et la base nucléique) est fortement amélioré lorsque l'ion phosphate est présent dans le milieu réactionnel. Pour rationaliser cette observation, il est nécessaire de supposer que la

glycosylation passe par un chemin réactionnel impliquant dans une de ses étapes une interaction d'un des réactifs avec le phosphate. A cet égard les travaux récents de Sponer¹⁶ et al sont particulièrement pertinents. Ces auteurs, prenant acte de ce que la glycosylation est thermodynamiquement défavorable, ont proposé plusieurs voies alternatives de synthèse des nucléosides. Sur base du fait que le diphosphate est un bon groupe partant, ils ont montré qu'il est thermodynamiquement favorable de former un nucléoside (noté RB, pour Ribose-Base) à partir d'un RPP (ribose diphosphate) même si la formation à partir du ribose non phosphorylé est défavorable. Ils notent la réaction correspondante :



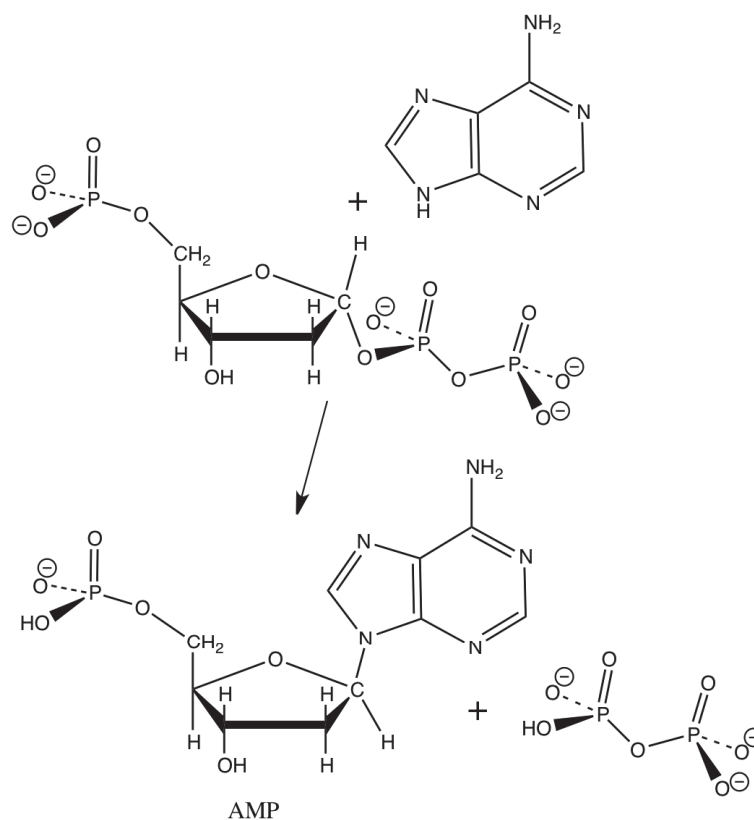
et avec B = adénine, une représentation plus précise, tenant compte entre autres de l'inversion de configuration, serait:



Or dans notre système, nous avons obtenu du PRPP par co-adsorption de ribose avec du phosphate inorganique sur la surface de la silice, et ce dès 70°C. Il est facile d'adapter la réaction précédente à la réaction de PRPP, formant



ou encore:



La clé de la glycosylation serait donc une préactivation par des groupements diphosphoryl. Ainsi, la présence de phosphate inorganique dans le milieu réactionnel, loin de représenter un facteur négatif, permettrait la synthèse "one pot" de l'AMP, faisant ainsi l'économie d'étapes de séparation toujours problématiques.

Finalement, il nous faut souligner un problème important que nous n'avons pas eu le temps d'étudier en détail: celui de la sélectivité de la glycosylation. Les mécanismes précédents sont écrits sur base de la formation de l'AMP telle qu'elle existe en biologie, mais la réaction de glycosylation pourrait très bien impliquer la formation d'un autre isomère, avec une régiosélectivité différente, comme il a été mentionné au Chapitre 1. La technique la plus concluante quant à la formation d'adénosine et d'AMP est jusqu'à présent la spectrométrie de masse en mode MALDI. Celle-ci ne peut pas à elle seule distinguer des isomères de position et la question de la régiosélectivité de la glycosylation reste donc ouverte.

D. Condensation AMP-UMP

Après avoir étudié la formation d'AMP sur des surfaces minérales prébiotiquement pertinentes, on a voulu tester la capacité de ces surfaces à catalyser l'oligomérisation. Cette dernière constitue une étape très importante dans le cadre de l'hypothèse du monde ARN. Elle permet d'avoir des chaînes de nucléotides suffisamment longues pour exhiber une fonctionnalité. Dans ce contexte, on a étudié la réactivité thermique du couple AMP-UMP après co-adsorption par IHN sur la surface de la silice.

I. Analyse FTIR

L'échantillon de 5% AMP : UMP /SiO₂ a été soumis à une activation thermique in situ et suivi par analyse FTIR sous vide. Les spectres obtenus sont présentés dans la figure V-44 (cadre C), en même temps que ceux de 5% AMP/SiO₂ (cadre A) et 5%UMP/SiO₂ (cadre B).

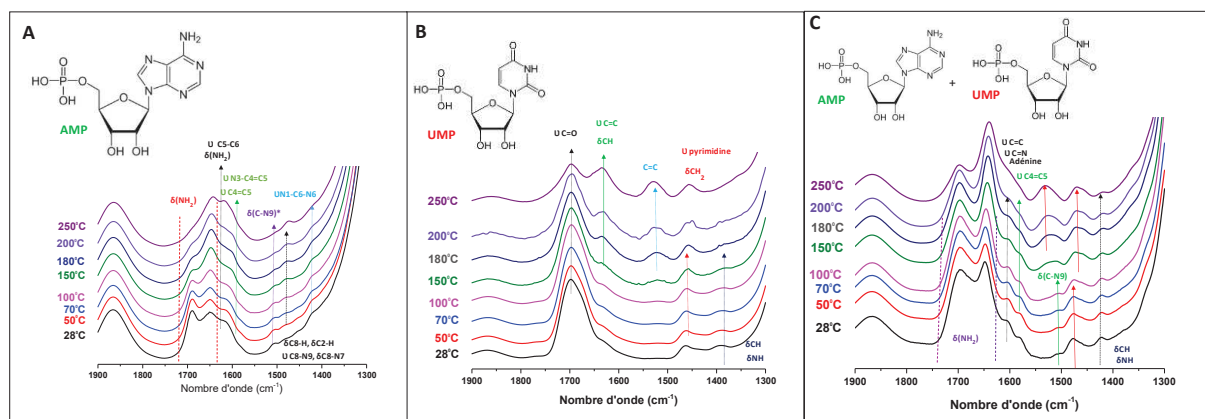


Figure V-44 : analyse FTIR sous vide de 5%AMP/ SiO₂ (A), 5%UMP/ SiO₂ (B) et de 5% AMP : UMP (1 : 1) /SiO₂

En se référant à la bibliographie, on a pu attribuer toutes les bandes observées dans la partie transparente du spectre. Les spectres d'AMP/SiO₂ ont été discutés dans la partie C-2. Pour l'échantillon UMP/SiO₂, les attributions des bandes observées sont présentées directement sur les spectres. Pour des températures de chauffage inférieures à 150°C, toutes les bandes détectées sont caractéristiques de l'UMP. Cependant, au-delà de cette température de chauffage, on observe l'apparition d'une nouvelle bande dans la région des C=C (1523 cm⁻¹). Aucun déplacement des autres bandes n'est observé lors du chauffage. L'apparition de la bande à 1523 cm⁻¹ indique que l'UMP n'est pas stable à haute température. Nous n'avons pas tenté de déterminer la nature du produit formé parce que notre objectif n'était pas principalement d'étudier les voies de dégradation des nucléotides.

Si nous considérons maintenant les spectres de l'échantillon 5% AMP : UMP /SiO₂, on observe une superposition des bandes caractéristiques d'AMP (observées dans la partie A de la figure) et de celles caractéristiques d'UMP (partie B). Aucun déplacement n'est détecté et aucune bande nouvelle n'apparaît. Lors de l'activation thermique, le seul changement significatif est l'apparition de la bande d'allongement C=C que nous avons attribuée plus haut à la dégradation de l'UMP.

D'après la bibliographie, la bande caractéristique de la liaison phosphodiester apparaît à 705 cm⁻¹.¹⁷ Cette partie de spectre est masquée par la silice. L'absence de modifications des spectres FTIR ne signifie donc pas forcément qu'il n'y a pas de condensation des nucléotides.

II. RMN de ³¹P (1 pulse)

L'échantillon 5% AMP : UMP (1 :1) /SiO₂ a été analysé après séchage à 70°C et après chauffage à 100°C/3h en RMN solide du ³¹P. Les spectres obtenus sont superposé avec ceux des références de de 5% AMP/SiO₂ et de 5% UMP/SiO₂ dans la figure (V-45).

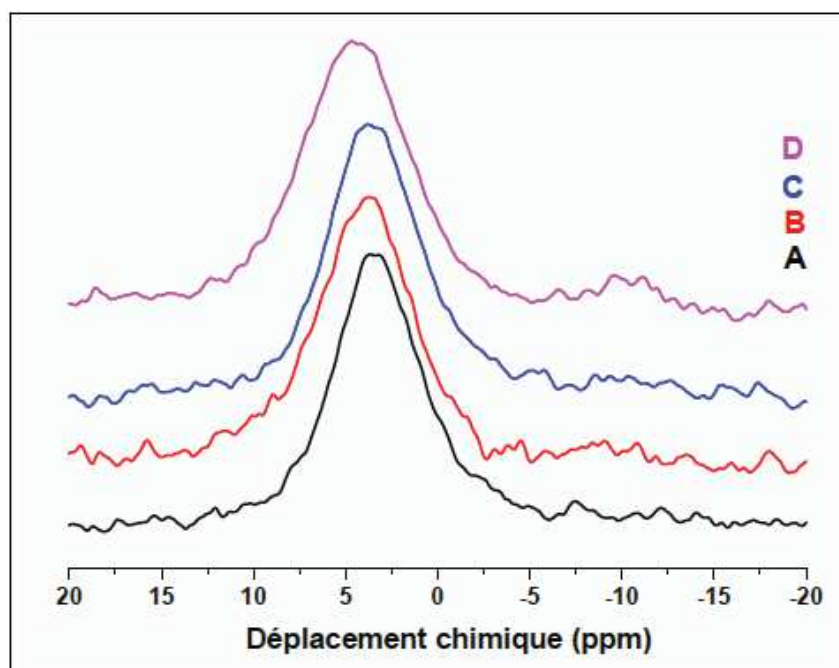


Figure V-45 : Spectres RMN de ³¹P (1pulse) de 5%AMP/SiO₂ (A) ; 5%UMP/SiO₂ (B) ; 5%AMP : UMP /SiO₂ après séchage (C) et après chauffage à 100°C/ 3h (D)

Les deux spectres A et B présentent un seul environnement de phosphore dans la région de Q⁰ avec des profils très similaires et centrés à la même position. Après co-adsorption des deux nucléotides sur la surface de la silice, le spectre obtenu est à nouveau très semblable aux deux précédents. Cependant, après activation thermique à 100°C/3h, le spectre présente deux

environnements de phosphore, Q^0 et Q^1 . Le pic caractéristique du Q^0 se déplace légèrement vers des déplacements chimiques plus élevés. Les décompositions de ces spectres sont présentées dans la figure (V-46).

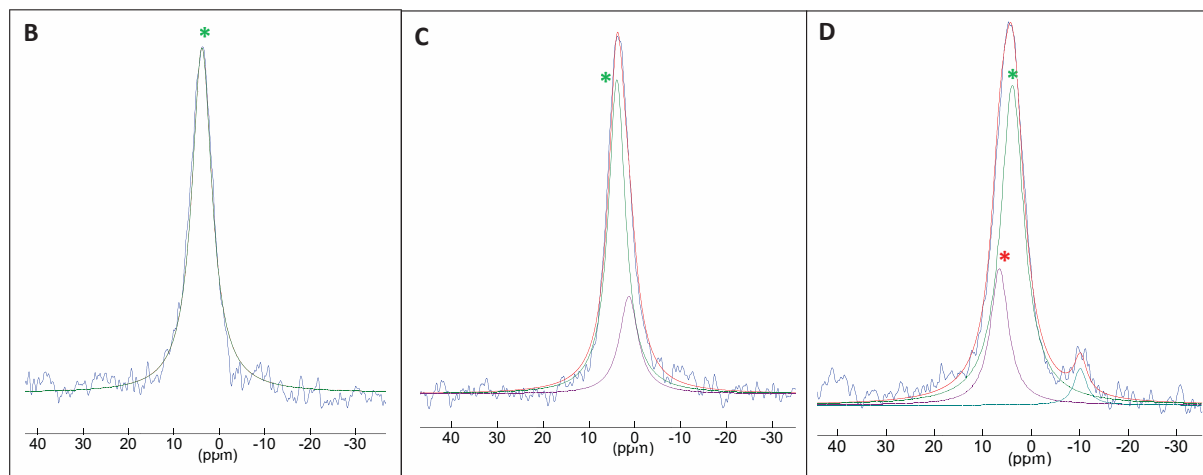


Figure V-46 : Décompositions des spectres RMN de ^{31}P , 1 pulse de 5%UMP/ SiO_2 (B) ; 5%AMP : UMP / SiO_2 après séchage (C) et après chauffage à $100^\circ\text{C}/3\text{h}$ (D)

Rappelons que le spectre de l'échantillon d'AMP/ SiO_2 , présenté dans la partie (C) de ce Chapitre, montre un pic principal à 3,9 ppm et un autre pic moins intense à 1,8 ppm. Le premier pic est caractéristique de l'AMP, il représente un %age relatif en phosphore égal à 85%. Le 2^{ème} pic est caractéristique d'un monophosphate adsorbé et représente un %age relatif de 15%.

Le spectre d'UMP/ SiO_2 (spectre B de la figure IV-46) présente un pic unique à 3,9 ppm. Ceci indique que les groupements phosphoryls d'UMP et d'AMP résonnent au même endroit en RMN de ^{31}P . Il n'est donc pas possible de différencier ces deux composés par RMN de phosphore. Le spectre de 5%AMP : UMP (1 :1) / SiO_2 analysé à Ta (spectre C) présente un pic principal à 3,9 ppm avec un %age relatif en phosphore de 75% et un autre secondaire à 1,3 ppm (monophosphate adsorbé, %age relatif = 25 %). Ces environnements sont identiques à ceux observés dans le spectre d'AMP/ SiO_2 .

Cependant l'activation thermique à 100°C provoque la disparition du monophosphate adsorbé et l'apparition de deux nouveaux environnements à + 5,7 et -10 ppm, respectivement. Le premier pic ne correspond pas ni à l'AMP, ni à l'UMP, ni au ribose phosphorylé. D'après la bibliographie, le déplacement chimique caractéristique d'une liaison phosphodiester se trouve dans la région comprise entre 2 et -4 ppm⁷. Cela ne semble pas correspondre au nouvel environnement.

Le deuxième pic formé lors de l'activation thermique apparait dans la région des Q¹, ce qui indique la formation de liaisons P-O-P. Le % relatif de Q¹ est égal à 5%. Peut-être le Q1 formé provient-il de la condensation d'une fraction du monophosphate adsorbé (25%) présent dans l'échantillon de 5%AMP : UMP /SiO₂.

Le pic principal reste celui du phosphore des nucléotides monophosphates à +3,9 ppm. Cet environnement présente un % relatif en phosphore de 72%. Cette valeur est légèrement inférieure à la quantité détectée après séchage (75%) mais la différence n'est pas forcément significative.

Donc, on ne détecte aucun pic clairement attribuable à d'éventuelles liaisons phosphodiesters; mais inversement, on observe un pic dont l'attribution est inconnue dans l'état actuel de nos connaissances.

III. Analyse MALDI

Vu les limitations analytiques rencontrés avec les techniques *in-situ* utilisés (FTIR et RMN) on a activé l'échantillon de 5%AMP : UMP /SiO₂ à 180°C/3h puis on l'a analysé après désorption pas spectrométrie de masse (MALDI). L'analyse a été effectuée en mode positif et en mode négatif. Seuls les spectres obtenus en mode positif sont présentés dans la figure (V-47). Les attributions figurent directement sur les spectres.

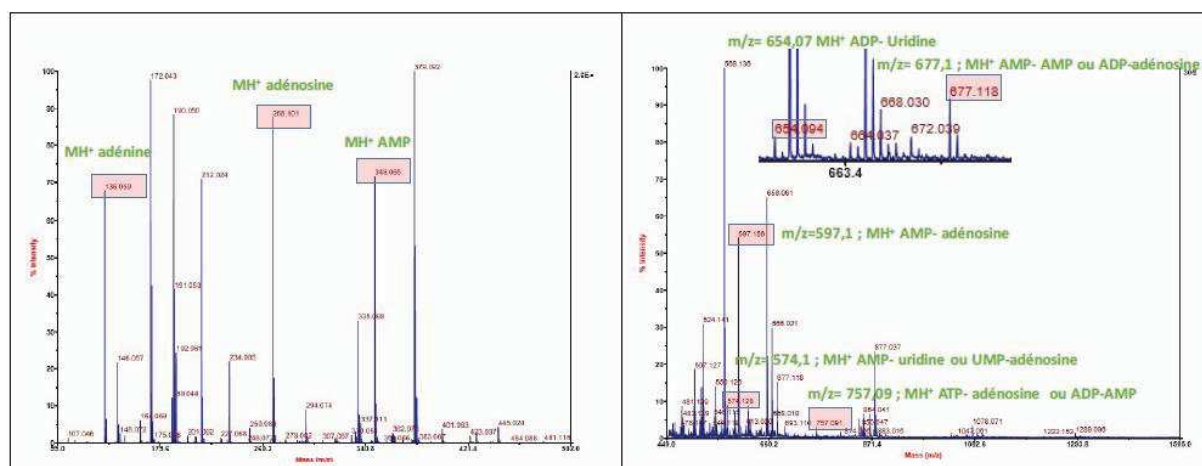
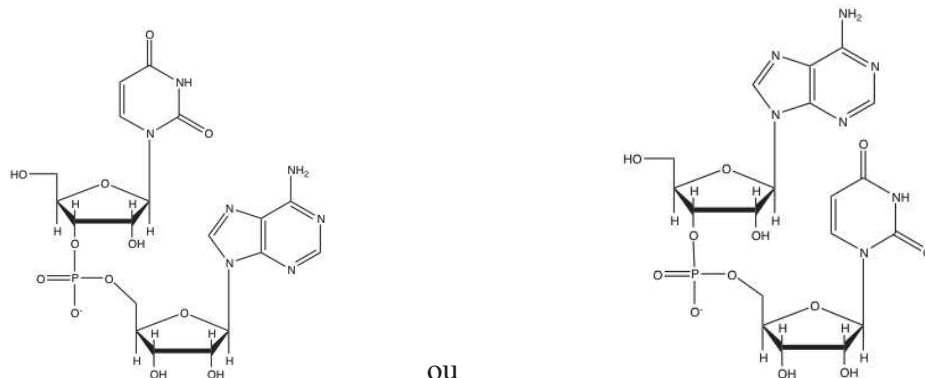


Figure V-47 : analyse MALDI, mode positif de 5%AMP : UMP (1 :1) /SiO₂ à 180°C/3h.

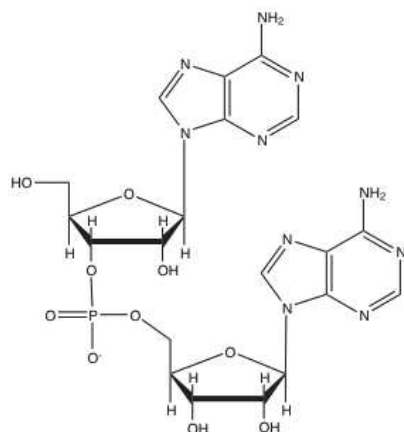
La première partie du spectre montre la présence des pics caractéristiques de l'adénine ($m/z=136,05$ uma ; $C_5H_5N_5 - H^+$), de l'adénosine ($m/z=268,10$ uma ; $C_{10}H_{13}N_5O_4 - H^+$) et de l'AMP ($m/z=348,09$ uma ; $C_{10}H_{14}N_5O_7P - H^+$).

Dans la deuxième partie, on observe plusieurs pics à des rapports m/z qui semblent correspondre à des dimères particuliers de nucléotides, à savoir :

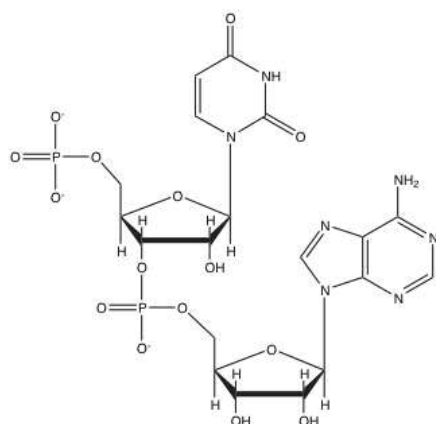
1- $m/z=574,1$: AMP-uridine ou UMP-adénosine,



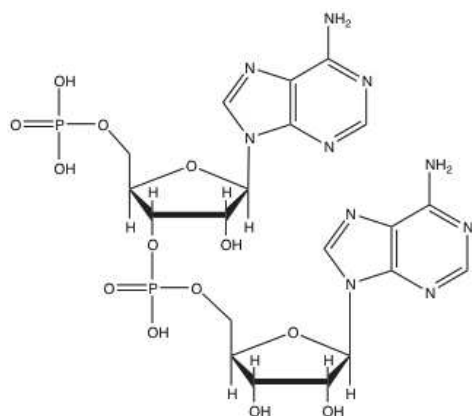
2- $m/z=597,1$: AMP-adénosine



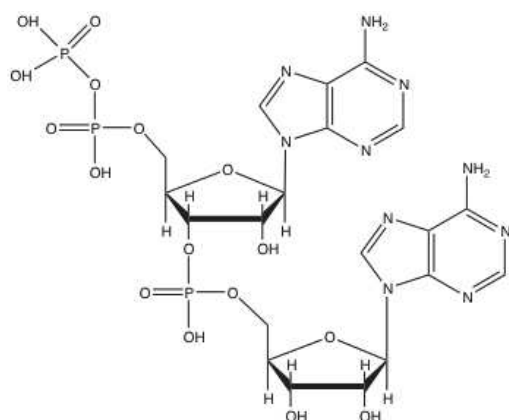
3- $m/z= 654,07$: AMP-UMP (ou ADP-uridine, ou UDP-adénine, ou UMP-AMP)



4- $m/z= 677,1$: AMP-AMP (ou ADP-adénosine)



5- $m/z = 757,09$: AMP-ADP (ou ADP-AMP, ou ATP-adénosine)



L'analyse en mode négatif n'apporte pas d'information supplémentaire par rapport au mode positif, à part la détection d'un pic caractéristique d'UMP⁻.

La spectrométrie de masse, encore une fois, ne permet pas de distinguer entre les isomères de même masse moléculaire : c'est pourquoi plusieurs attributions sont possibles pour la plupart des pics. Néanmoins, la formation de liaisons phosphodiester entre deux nucléotides est l'explication la plus convaincante des masses observées, et la plus économique, car elle rend compte de toutes les espèces au moyen d'un seul type de réaction. Il faut toutefois supposer que le ribose portant la liaison ester en 3' (si c'est bien par ce carbone qu'il est lié, ce qui n'est pas entièrement démontré) peut se trouver sous plusieurs formes différentes au niveau du carbone 5' : non phosphorylé, monophosphorylé ou diphosphorylé. La coexistence de ces différentes espèces n'est sans doute pas étonnante vu les réactions de dismutation qui ont été démontrées pour AMP / SiO₂².

On notera aussi qu'on détecte des dinucléotides combinant deux adénosines, ou une adénosine et une uridine, mais pas deux uridines.

IV. Conclusion :

De même que les réactions de phosphorylation et de glycosylation, la réaction d'oligomérisation des nucléotides est défavorable thermodynamiquement en solution. Comme la phosphorylation et la glycosylation, elle implique une condensation avec formation d'une molécule d'eau (en l'occurrence entre les groupes P-OH du phosphate d'un nucléotide, et les C-OH du ribose d'un second nucléotide). On pouvait donc légitimement se demander si la condensation des nucléotides était favorisée par leur dépôt sur la surface de silice, suivi d'un séchage, comme on l'avait déjà établi pour les deux autres réactions.

Notre étude est encore préliminaire. Elle souligne les limitations analytiques rencontrées par des techniques d'analyse *in-situ* des échantillons comme l'IR ou la RMN. Des résultats positifs ont été obtenus par une technique d'analyse *in situ*, la spectrométrie de masse en mode MALDI appliquée à la solution de désorption. Il s'avère qu'une activation relativement sévère (180°C) aboutit à la dimérisation des nucléotides déposés sur la surface de silice. Cette dimérisation se complique de réactions de dismutation. Toutefois, elle n'est pas aléatoire mais montre une certaine spécificité: dans un système composé de deux nucléotides en proportion égale (AMP + UMP), les dimères ne se forment pas dans les proportions statistiques puisqu'on n'observe pas les dimères contenant deux bases puriques (p.ex. UMP-UMP)

Les scénarios de surface présentent ainsi une nouvelle opportunité pour l'étude de l'oligomérisation dans des conditions prébiotiques. Les expériences devraient être systématisées et affinées pour pouvoir évaluer le potentiel de ces scénarios.

Références bibliographiques

1. (a) Zhuravlev, L., The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *173* (1), 1-38; (b) Rimola, A.; Costa, D.; Sodupe, M.; Lambert, J.-F.; Ugliengo, P., Silica surface features and their role in the adsorption of biomolecules: computational modeling and experiments. *Chem. Rev.* **2013**, *on line*.
2. Georgelin, T.; Jaber, M.; Onfroy, T.; Hargrove, A.-A.; Costa-Torro, F.; Lambert, J.-F., Inorganic Phosphate and Nucleotides on Silica Surface: Condensation, Dismutation, and Phosphorylation. *Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117* (24), 12579-12590.
3. Ben Shir, I.; Kababya, S.; Schmidt, A., Binding specificity of amino acids to amorphous silica surfaces: Solid-state NMR of glycine on SBA-15. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (17), 9691-9702.
4. (a) Keefe, A. D.; Miller, S. L., Are Polyphosphates or Phosphate Esters Prebiotic Reagents? *Journal of Molecular Evolution* **1995**, *41* (6), 693-702; (b) Kornberg, A., Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *Journal of Bacteriology* **1995**, *177* (3), 491-496.
5. (a) Tajmir-Riahi, H.; Theophanides, T., Adenosine-5'-monophosphate complexes of Pt (II) and Mg (II) metal ions. Synthesis, FT · IR spectra and structural studies. *Inorganica chimica acta* **1983**, *80*, 183-190; (b) Angell, C. L., An Infrared Spectroscopic Investigation of Nucleic Acid Constituents. *J. Chem. Soc.* **1961**, 504-515.
6. Gross, A.; Abril, O.; Lewis, J. M.; Geresh, S.; Whitesides, G. M., Practical synthesis of 5-phospho-D-ribosyl. alpha.-1-pyrophosphate (PRPP): enzymatic routes from ribose 5-phosphate or ribose. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105* (25), 7428-7435.
7. Cade-Menun, B. J., Characterizing Phosphorus in Environmental and Agricultural Samples by ³¹P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Talanta* **2005**, *66* (2), 359-371.
8. (a) Ben Shir, I.; Kababya, S.; Schmidt, A., Molecular Details of Amorphous Silica Surfaces Determine Binding Specificity to Small Amino Acids. *The Journal of Physical Chemistry C* **2014**, *118* (15), 7901-7909; (b) Ben Shir, I.; Kababya, S.; Amitay-Rosen, T.; Balazs, Y. S.; Schmidt, A., Molecular Level Characterization of the Inorganic– Bioorganic Interface by Solid State NMR: Alanine on a Silica Surface, a Case Study. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114* (18), 5989-5996.
9. Rimola, A.; Costa, D.; Sodupe, M.; Lambert, J.-F.; Ugliengo, P., Silica surface features and their role in the adsorption of biomolecules: computational modeling and experiments. *Chemical reviews* **2013**, *113* (6), 4216-4313.
10. (a) Meng, M.; Stievano, L.; Lambert, J. F., Adsorption and thermal condensation mechanisms of amino acids on oxide supports. 1. Glycine on silica. *Langmuir* **2004**, *20* (3), 914-923; (b) Lambert, J.-F., Adsorption and polymerization of amino acids on mineral surfaces: A review. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **2008**, *38* (3), 211-242; (c) Rimola, A.; Sodupe, M.; Ugliengo, P., Aluminosilicate Surfaces as Promoters for Peptide Bond Formation: An Assessment of Bernal's Hypothesis by ab Initio Methods. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8333-8344.
11. Georgelin, T.; Jaber, M.; Fournier, F.; Laurent, G.; Costa-Torro, F.; Maurel, M. C.; Lambert, J. F., Stabilization of ribofuranose by a mineral surface. *Carbohydrate research* **2015**, *402*, 241-4.
12. Fuller, W. D.; Sanchez, R. A.; Orgel, L. E., Studies in prebiotic synthesis: VI. Synthesis of purine nucleosides. *Journal of molecular biology* **1972**, *67* (1), 25-33.
13. Šponer, J. E.; Šponer, J.; Fuentes-Cabrera, M., Prebiotic routes to nucleosides: a quantum chemical insight into the energetics of the multistep reaction pathways. *Chemistry—A European Journal* **2011**, *17* (3), 847-854.
14. Gasowska, A.; Lomozik, L., Mode of coordination and stability of Cu (II) and Zn (II) complexes with adenosine, deoxyadenosine, cytidine and deoxycytidine. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly* **1995**, *126* (1), 13-22.
15. De Duve, C.; Miller, S. L., Two-dimensional life? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88* (22), 10014-10017.

16. Šponer, J. E.; Šponer, J.; Di Mauro, E., Four Ways to Oligonucleotides Without Phosphoimidazolides. *Journal of Molecular Evolution* **2016**, *82* (1), 5-10.
17. de Jager, H.-J.; Prinsloo, L. C., The Dehydration of Phosphates Monitored by DSC/TGA and In Situ Raman Spectroscopy. *Thermochimica Acta* **2001**, *376* (2), 187-196.

Chapitre V

Formation d'AMP sur la Saponite

VI. Chapitre V : Formation d'AMP sur la saponite

A. Introduction

Ce chapitre est dédié à l'étude de la réactivité de la saponite dans la formation de l'AMP. Le choix de ce minéral est motivé prébiotiquement¹. Sa structure lamellaire et sa réactivité liée à l'espace interfoliaire et aux bords permet d'envisager la coexistence de plusieurs types de réactivité vis-à-vis des réactions de condensation. La structure et les propriétés de cette famille de phyllosilicates sont présentées dans le chapitre I.

La même méthodologie que précédemment a été appliquée dans cette partie de l'étude. La première partie est dédiée à la condensation de phosphates inorganiques alors que la deuxième partie est consacrée aux réactions de glycosylation et de phosphorylation par co-adsorption des composants principaux : D-ribose, KH_2PO_4 et adénine.

B. Adsorption du KH_2PO_4

Les phosphates condensés sont les amorceurs de la réaction de phosphorylation. C'est pourquoi, dans un premier temps, l'étude de la formation de polyphosphates sur la saponite constitue une étape primordiale. La réactivité thermique vis-à-vis de la polycondensation des phosphates sera l'objet de notre attention.

I. Analyse de diffraction rayons X (DRX)

Le diffractogramme de Rayons-X de la saponite présente les bandes hkl caractéristiques d'une smectite (figure VI.I). La distance réticulaire $d(001)$ est égale à 1,21 nm. Cette valeur correspond à la somme de l'épaisseur d'un feuillet de type talc (0,96 nm) et de l'épaisseur d'une couche d'eau ($2 \times 0,25$ nm) entourant les ions Na^+ présents dans l'espace interfoliaire, en accord avec les valeurs publiées dans la littérature². La distance réticulaire $d(060)$ est égale à 0,152 nm, indiquant ainsi un caractère purement trioctaédrique².

La figure VI-1 présente les diffractogrammes de la saponite dans la région des d_{001} avant et après adsorption par IHN de 3 pourcentages massiques différents de Pi (5, 10 et 15%).

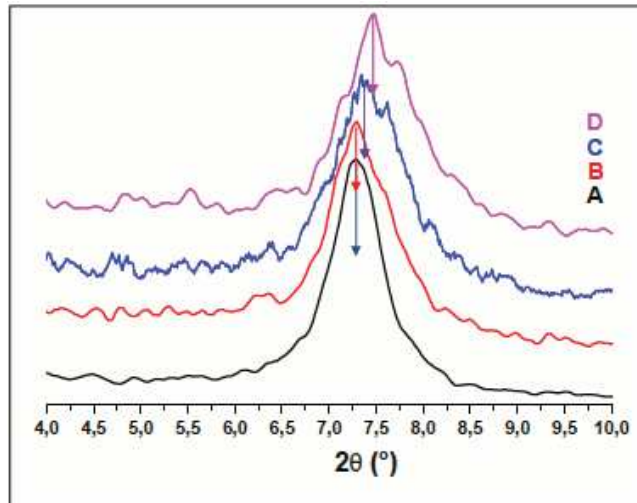


Figure VI-1 : Diffractogrammes de Rayons-X de la saponite de départ (A) et des échantillons préparés par IHN de x %Pi/sap avec x=5% (B), 10% (C) et 15% (D).

Après adsorption de 5% de phosphates sur la saponite, aucun changement n'est observé au niveau du d_{001} de saponite. Cependant, l'augmentation de quantités de phosphates induit un léger décalage vers les grands angles (et donc les faibles distances interréticulaires. Une explication possible peut être l'échange entre les cations Na^+ et K^+ qui peut induire une déshydratation partielle. Les valeurs de d_{001} observées sont intermédiaires entre celles des formes à une monocouche d'eau (environ 1,21 nm) et déshydratée (environ 0,96 nm). Ces positions intermédiaires peuvent être liées à une interstratification aléatoire de feuillets plus ou moins hydratés.³

II. Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les échantillons Pi / sap (0, 5, 10 et 15 %) pulvérulents ont été soumis à l'analyse thermogravimétrique. Les courbes DTG obtenues sont représentées à la figure VI-2.

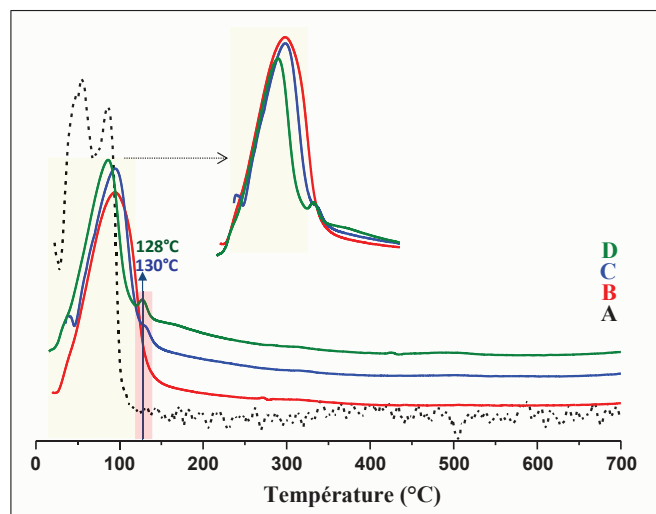


Figure VI-2 : Courbes DTG des échantillons de x % Pi/Sap préparés par IHN avec x= 0% (A), 5% (B), 10% (C) et 15% (D).

La courbe de la saponite montre deux pertes de masse avec des maxima vers 55°C (5,84% wt) et 86°C (4,2%). Celles-ci correspondent à la perte d'eau physisorbée et interfoliaire. Après adsorption de différentes densités massiques en Pi, on observe un changement de profil des courbes DTG. La désorption de l'eau est représentée par une seule perte de masse centrée vers une température moyenne de 90°C, dans les trois échantillons. Les pertes de masse détectées sont égales à 7,2, 5,2 et 4,8% respectivement pour les échantillons à 5, 10 et 15% en Pi. Ceci indique que plus la quantité de phosphates augmente, la quantité d'eau diminue. On peut penser que les molécules de phosphates ont substitué au moins partiellement celles d'eau.

Dans la région comprise entre 100 et 150°C, une perte de masse de 0,5% est observée pour les échantillons à 10 et 15% Pi/sap. Une condensation de phosphates induirait une perte de 1,3 et 1,9%, respectivement pour ces deux échantillons ; on sait que le phosphate massique se condense dans la gamme de température comprise entre 250 et 320°C (chapitre I) mais nos phosphates introduits sont probablement en interaction avec la saponite.

A ce stade de l'étude, nous ne pouvons pas nous avancer sur la formation de polyphosphates. Les pertes supplémentaires de masse entre 100 et 150°C et notamment l'évènement bien résolu à 128-130°C pourraient être attribués à une condensation des monophosphates qui serait alors très partielle puisque leur intégration correspond à nettement moins qu'une demi-molécule d'eau par phosphate initial : cela signifie qu'une partie significative des monophosphates resteraient non condensés. Mais on ne peut pas exclure sur base des seules données ATG qu'une condensation supplémentaire ait lieu à des températures plus basses, où elle serait masquée par la contribution importante de la désorption de l'eau. Des données spectroscopiques seront nécessaires pour trancher sur l'état de condensation des phosphates après activation à température modérée.

I. RMN de ³¹P (1pulse)

L'échantillon 5%Pi / sap a été analysé en ³¹P RMN (1pulse) avant et après activation thermique. Les spectres obtenus ainsi que leurs décompositions sont montrés dans la figure VI-3.

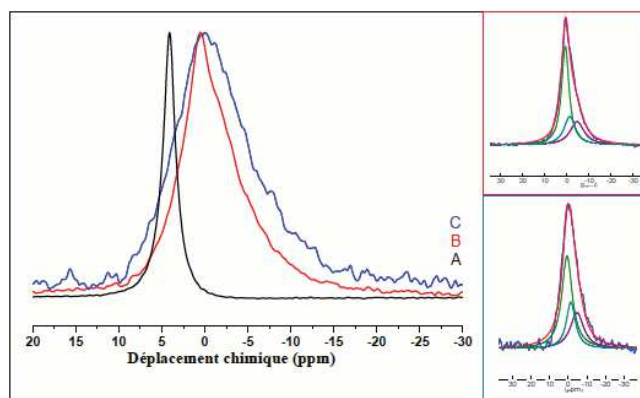


Figure VI-3 : Spectres RMN (1 pulse) ^{31}P du phosphate massique (A) et de l'échantillon de 5% Pi/sap avant (B) et après activation thermique à 100°C/3h (C).

Dans les deux spectres, avant et après activation thermique, on observe un pic large centré vers 0,4 ppm et occupant la région de Q^0 et Q^1 . Cependant, il est clairement plus large dans le spectre de l'échantillon activé que dans celui acquis à Ta.

La décomposition de ces spectres montre la présence de trois environnements de phosphore dont deux apparaissent dans la région de Q^0 et qui peuvent correspondre à des monophosphates dans des états différents, par exemple en interaction avec deux sites différents de l'argile. Le troisième pic est plutôt situé dans la région des sites Q^1 , indiquant la présence d'une quantité significative de diphosphates après un simple séchage. Après chauffage, on observe des % ages relatifs en phosphore dans les 3 environnements presque inchangés, tableau V-1. Ceci indique que l'activation thermique à 100°C pendant 3h ne provoque pas la formation des quantités supplémentaires de polyphosphates.

Tableau VI-1 : Résultats des décompositions des spectres de 5%Pi/sap analysé avant (Ta) et après activation thermique (100°C/3h)

	δ (ppm)	% relatif en phosphore	Largeur à mi-hauteur (ppm)
5%Pi/sap, Ta	0,65	53	4,10
	-1,4	24	6,35
	-4,65	24	7,80
5%Pi/sap, Ta/100°C, 3h	0,65	52	6,80
	-1,4	23	5,90
	-4,7	26	8,62

La seule différence détectée entre les deux échantillons est la largeur à mi-hauteur du monophosphate observé à 0,6 ppm. Ce pic augmente de largeur de 4,1 à 6,8 ppm. Peut-être que ces monophosphates sont en interaction avec les molécules d'eau du milieu. Après chauffage, on perd une partie des molécules d'eau et par la suite les monophosphates associés sont moins mobiles.

L'analyse en 1 pulse n'est pas suffisante pour trancher sur les différents sites d'interaction du phosphore. Cela nécessite une investigation plus profonde, par exemple des analyses 2D (^1H , ^{31}P) ou (^{31}P , ^{31}P).

C. Adsorption de D-Ribose

I. Diffraction des rayons X (DRX)

Les diffractogrammes des échantillons x% R / sap sont montrés à la Figure VI-4.

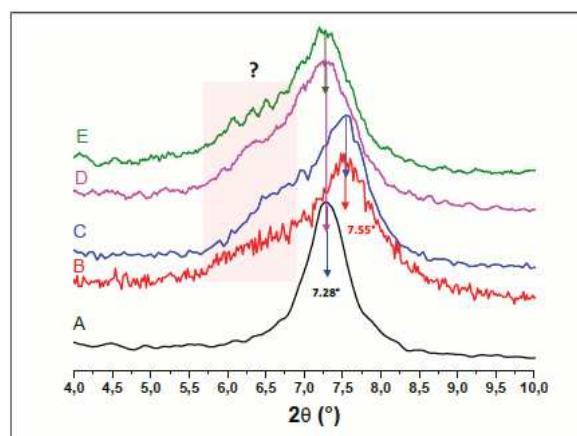


Figure VI-4 : Diffractogrammes de la saponite de départ (A) et des échantillons préparés par IHN de x % Ribose / sap avec x = 5% (B), 10% (C) 15% (D) et 30% (E).

Ils comportent tous un épaulement clairement marqué aux faibles valeurs de 2θ : 6,3 à 6,6°, soit $d_{001} = 1,34$ à 1,40 nm. Ces valeurs sont un peu inférieures à celle de la forme "à deux couches d'eau » ; il est d'autre part peu probable que ces échantillons soient plus hydratés que la saponite de départ, puisque les TG indiquent exactement l'inverse. Il est donc probable que nous sommes en présence d'un intercalât, où au moins une partie des molécules de ribose ont pénétré dans l'espace interlamellaire et maintiennent les feuillets séparés d'une distance correspondant à l'épaisseur d'une molécule de ribose. L'intercalation ne touche pas tous les espaces interlamellaires, seulement un quart à un tiers d'entre eux.

II. Analyse infrarouge (FTIR)

Après adsorption par IHN de D-ribose sur la saponite, sa réactivité thermique a été étudiée par spectroscopie infrarouge in-situ comme le montre la figure VI-5.

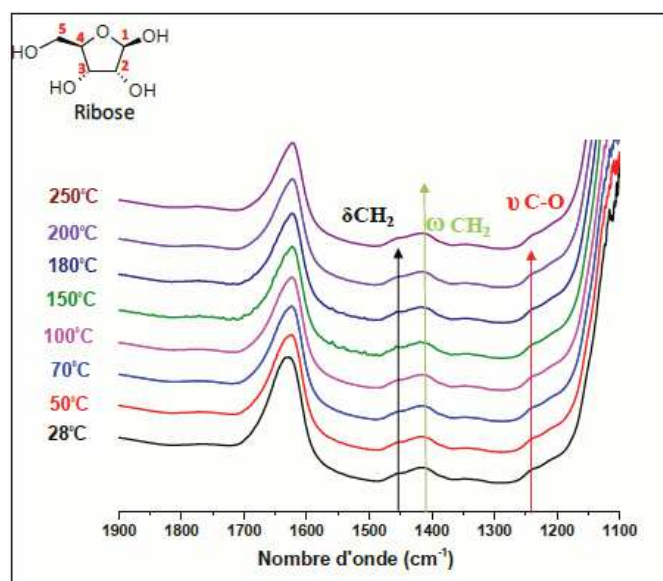


Figure VI-5 : Spectres FTIR de 5% Ribose/sap soumis à une activation thermique sous vide , δ : bending mode, ω : wagging mode.

Avant activation thermique, on observe trois bandes de vibration caractéristiques du ribose : δ CH₂, ω CH₂ et ν C-O. La fenêtre de transparence de la saponite est plus étendue que celle de la silice, où les ν C-O n'étaient pas observables (cf. Chapitre 3).

Après chauffage à 250°C, aucun changement n'est observé, et notamment les bandes caractéristiques de produits de dégradation du ribose (Chapitre 3) ne sont pas visibles. Nous pouvons dès à présent constater que la saponite stabilise le ribose thermiquement jusqu'à 250°C, résultat très intéressant étant donné qu'avec la silice, la température de stabilisation est moins élevée (130°C).

III. Analyse ¹³C CP MAS RMN

La figure VI-6 compare les spectres RMN ¹³C en CP MAS du ribose massif et du ribose adsorbé sur la saponite.

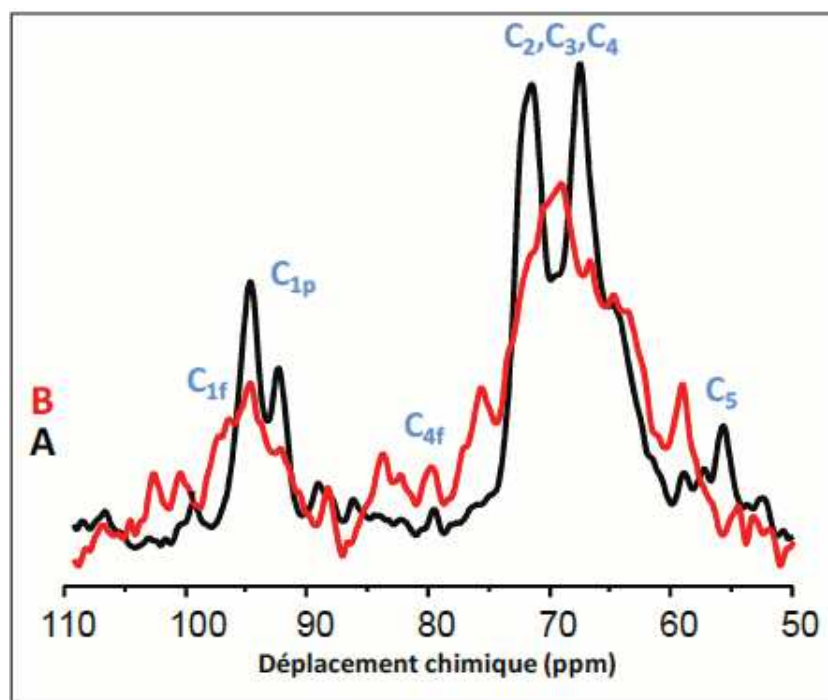


Figure VI-6 : Spectres ^{13}C CP-MAS du ribose massique (A) et de 10% Ribose/ sap (B).

Le spectre A du ribose massique montre que ce dernier est présent uniquement sous sa forme pyranose. Après adsorption par IHN sur la saponite, en plus de la forme pyranose, des pics caractéristiques de C_{4f} et C_{1f} , c'est à dire de la forme anomérique ribo-furanose, sont présents. Le résultat obtenu signifie donc qu'une interaction entre le ribose et l'argile a abouti à la stabilisation de sa forme furanose, comme sur la silice, même si le faible rapport signal/bruit rend difficile de quantifier cet effet. Un déplacement de +4 ppm des C_5 est également observé. Les $-\text{OH}$ portés par quelques molécules de ribose (le reste étant intercalé et ne voit pas forcément les bords) sont probablement en interaction avec les $-\text{OH}$ de bords ou avec des molécules d'eau à la surface. Notons que le profil de ce spectre ressemble à celui du ribose / SiO_2 , où on a observé un déplacement des C_5 et une apparition de la forme ribo-furanose. Il est un fait que les groupes de bord de la saponite incluent des silanols semblables à ceux de la surface de la silice mais au moins une partie des riboses ne sont pas en interaction avec eux, étant contenus dans l'espace interlamellaire.

D. Co-adsorption de D-Ribose et du KH_2PO_4

I. Analyse thermogravimétrique (ATG)

De façon inattendue, les TG de l'échantillon 5% Rib + Pi (1 :1) / Sap ne montre pas de pics attribuables à la dégradation de la matière organique. Le thermogramme ne montre que deux événements thermiques identifiables, qui se trouvaient tous deux dans la saponite brute de

départ : un endotherme dans la région 50-80°C attribuable à l'élimination d'eau physisorbée et interlamellaire, et un pic à 830°C associé à un effet thermique complexe qui correspond à la décomposition de la phase saponite⁴ accompagnée de condensation des OH structuraux,

Le calcul de la perte de masse d'eau associée à l'évènement à basse température fournit : 9,6 % (par rapport à la masse restant à 700°C) pour la saponite brute, 5, 9% pour 5%Pi/sap, 7,5 % pour 5% Rib + Pi (1 :1) / Sap. En d'autres termes, l'échantillon contenant du ribose et du phosphate est plus riche en eau que celui contenant uniquement des phosphates, mais moins que la saponite de départ. Nous ne pensons pas en effet que l'évènement à 50-80°C puisse contenir une contribution de la perte de matière organique, la température étant nettement trop basse pour activer les molécules de ribose comme le montrent les autres techniques de caractérisation. On peut alors se poser la question : que deviennent les molécules de ribose contenues dans l'échantillon lors de l'activation thermique ? Certes, l'infra-rouge suggère une grande stabilité thermique du ribose (au moins jusque 250°C), mais il est difficile de croire qu'il soit stable jusque 800°C. Darder et Ruiz-Hitzky⁵ ont étudié des nano composites constitués de saccharose intercalé dans des phyllosilicates, et observé une transformation des sucres intercalés en matériaux carbonés par une forme de pyrolyse *in situ*. Cela expliquerait que la matière organique ne soit pas intégralement brûlée, contrairement à ce qui se passe sur silice, mais il reste étonnant qu'on n'observe aucune perte de masse.

II. Diffraction des rayons X (DRX)

La figure VI-7 compare les diffractogrammes des échantillons contenant du phosphate en absence (5%Pi / sap) et en présence de ribose 5% Rib + Pi (1 :1) / Sap.

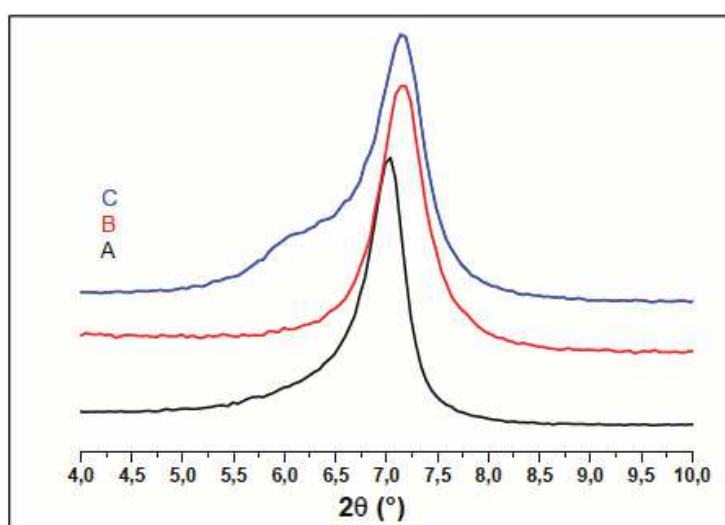


Figure VI-7 : Diffractogrammes de la saponite de départ (A) et des échantillons 5%Pi / sap (B) et 5%Ribose + Pi (1 :1) / sap (C).

On constate une diminution de la d_{001} par rapport à la saponite de départ dans les deux cas. Nous l'avons précédemment attribuée à une déshydratation de l'espace interfoliaire suite à l'échange partiel de Na^+ par K^+ .

D'autre part, le diffractogramme de l'échantillon contenant ribose et phosphate est le seul à montrer un épaulement avec une distance réticulaire de 1,40 nm. Ceci peut provenir de l'intercalation partielle du ribose dans l'espace interfoliaire de certains feuillets, avec certains feuillets intercalés et d'autres non intercalés.

III. Analyse infrarouge (FTIR)

Après co-adsorption du D-ribose et du phosphate inorganique sur la saponite, la réactivité thermique de l'échantillon a été analysée par IR in situ lors d'une série d'activations thermiques sous vide. Le résultat obtenu est présenté dans la figure VI-8.

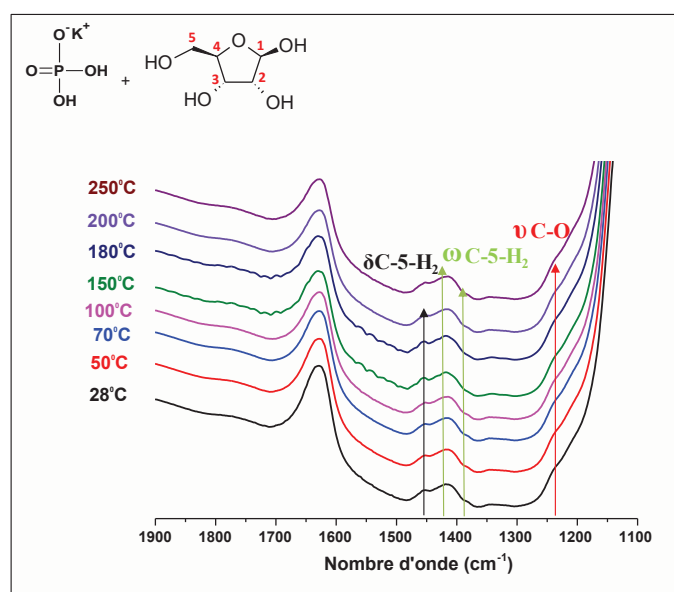


Figure VI-8 : Spectres FTIR de l'échantillon 5% Rib + Pi (1 :1) /sap soumis à une activation thermique sous vide
, δ : bending mode, ω : wagging mode, ν : stretching mode.

Les spectres obtenus sont similaires à ceux de l'échantillon de Ribose / sap déjà commenté. Les bandes caractéristiques du ribose sont observées et, sans aucune modification notable, quel que soit la température appliquée.

D'après la bibliographie (cf. Chapitre 4), les bandes caractéristiques de la phosphorylation du ribose se trouvent à 900, 869, 815 et 777 cm^{-1} . La zone de transparence du support saponite étant différente de celle du support silice, il est nécessaire d'observer de plus près la région contenant ces bandes afin de déterminer si elles pourraient être observables.

Dans la région comprise entre 700 et 900 cm^{-1} , deux bandes larges centrées à 743 et 796 cm^{-1} sont apparentes pour les deux échantillons Ribose / sap et 5%Ribose +Pi (1 :1) / sap (figure VI-9).

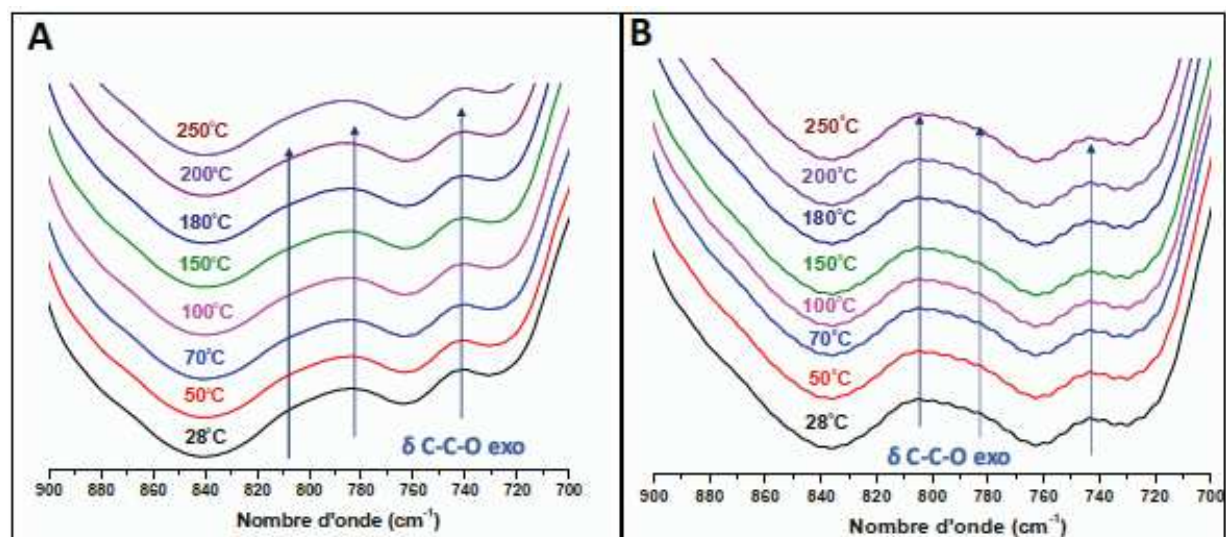


Figure VI-9 : Spectres FTIR de l'échantillon 5% Ribose / sap (A) et 5%Rib +Pi (1 :1) / sap soumis à une activation thermique sous vide.

Ces bandes sont en fait caractéristiques de la liaison C-C-O du ribose. La présence de celles-ci nous empêche de détecter les bandes caractéristiques de la phosphorylation, si elles existent. Donc, à partir de l'analyse en IR on ne peut pas déterminer facilement si une phosphorylation a eu lieu.

IV. Analyse ^{31}P RMN (1pulse)

L'activation thermique de l'échantillon 5%Rib + Pi (1 :1) / sap a été réalisée par chauffage à 100°C/ 3h sous flux d'air sec. L'influence de cette activation a été étudiée exclusivement par RMN du solide de l'isotope ^{31}P . Les spectres RMN de ^{31}P de cet échantillon, ainsi que leurs décompositions, sont montrés à la figure V-10 avant et après activation thermique. Pour faciliter la comparaison, on a superposé ces spectres avec ceux de Pi/sap acquis dans les mêmes conditions, Ta et 100°C/3h.

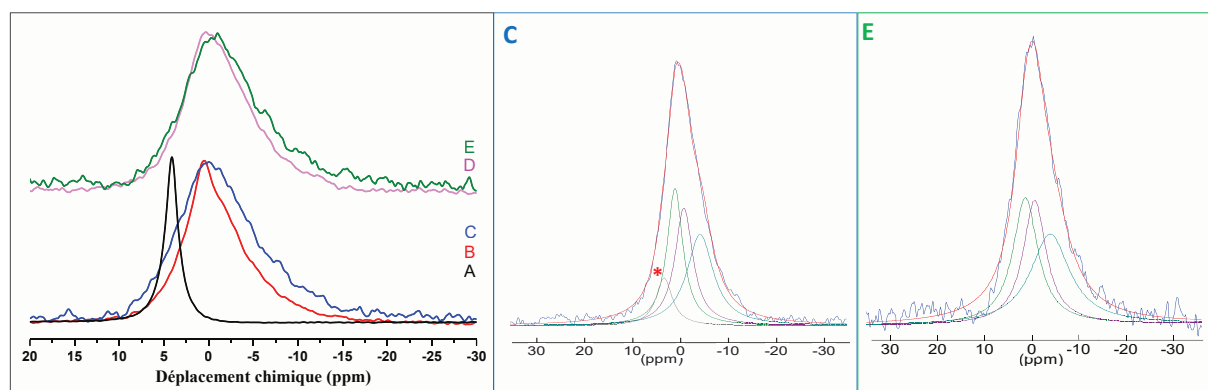


Figure VI-10 : Spectres ^{31}P RMN (1 pulse) du phosphate massique (A) et des échantillons 5% Pi / sap (B) ; 5%Rib + Pi (1 :1)/ sap (C) ; 5% Pi / sap, 100°C/3h (D) et 5%Rib + Pi (1 :1)/ sap, 100°C/3h (E); décomposition des spectres C et E.

Les quatre échantillons analysés présentent des profils quasi similaires. A température ambiante, les deux échantillons présentent un pic large entre 10 à et -15ppm ; cependant, ce pic est plus large avec le 5%Rib + Pi (1 :1) / sap qu'avec la référence de 5%Pi / sap. La décomposition de ces spectres montre en fait l'apparition d'un nouvel environnement de phosphore à 2,9 ppm avec un pourcentage relatif égal à 10%. Le pourcentage relatif du pic présent à -4,6 ppm augmente de presque 9% par rapport à l'échantillon de Pi/sap. Ceci indique qu'après co-adsorption des deux composants on observe l'apparition de deux nouveaux environnements, le premier à 2,9 ppm tandis que le deuxième est inclus dans le pic observé à -4,6 ppm. Le pic à 2,9 ppm peut correspondre à du ribose phosphorylé en position 5' ; mais contrairement au système correspondant supporté sur silice, nous n'observons pas de pic à -10 ppm, dont la coexistence avec celui à 2,9 ppm indiquerait la présence de PRPP.

L'activation thermique à 100°C/3h ne présente aucune différence significative entre l'échantillon contenant du ribose (E) et la référence sans ribose (D), à part un faible élargissement dans la région des sites Q¹. D'après la quantification de ces deux spectres, on constate la présence des mêmes environnements de phosphore dans les deux cas. Cependant, la composante à -4,67 ppm devient plus large (espèce moins mobile) et plus intense. Il augmente de 11, 3% en pourcentage relatif par rapport à celui de Pi / sap, 100°C. Les autres environnements présentent les mêmes mobilités que ceux de la référence.

E. Co-adsorption de D-Ribose, KH_2PO_4 et adénine

I. Diffraction de rayons X (DRX)

Le diffractogramme de rayons X de la saponite et des différents échantillons préparés avec des pourcentages de phosphates variables et de l'adénine sont présentés dans la figure VI-11.

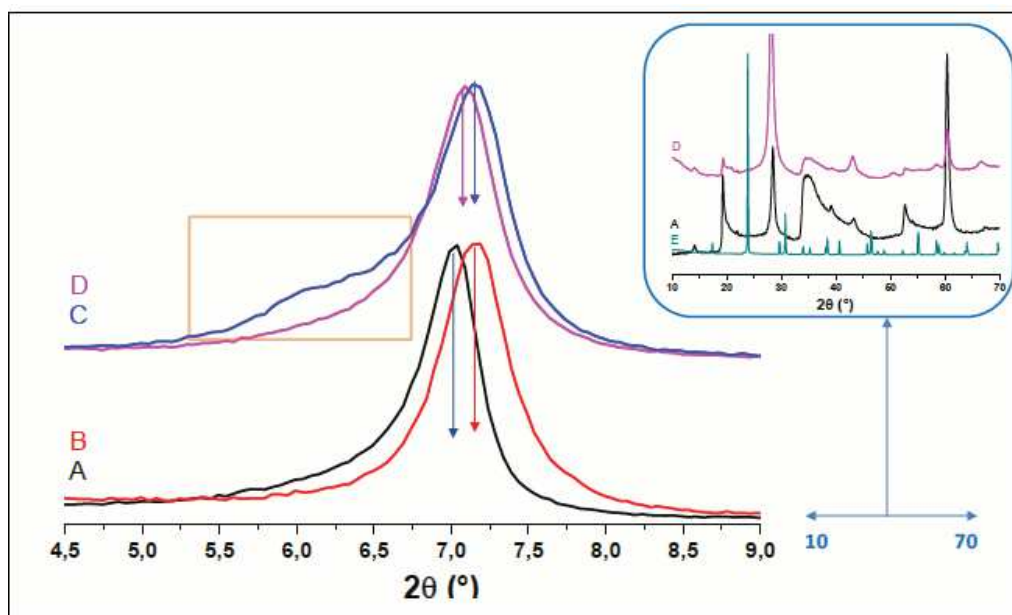


Figure VI-11 : Diffractogrammes de Rayons X de la saponite de départ (A) et des échantillons 5%Pi / sap (B) ,5% Rib + Pi (1 :1)/ sap (C) et AR1Pi / sap (D).

Aucun précipité de phosphate massique n'a été détecté. Tous les échantillons montrent uniquement des pics attribuables à la saponite et présentent des valeurs proches de la d_{001} , avec une légère contraction que nous avons attribuée à une interstratification entre feuillets hydratés et feuillets déshydratés échangés au potassium, pour Pi / sap et Rib + Pi (1 :1) / sap mais pas AR1Pi / sap. L'épaule que nous avons attribué à une intercalation partielle du ribose est observé pour l'échantillon Rib + Pi (1 :1) / sap mais pas pour AR1P / sap..La présence d'adénine interfère donc avec la spéciation du ribose.

II. Analyse infrarouge (FTIR)

L'échantillon AR1P / sap a subi une activation thermique couplée à une analyse IR in situ. Afin de faciliter les attributions, on a analysé dans les mêmes conditions la réactivité thermique d'une série de composés de référence (adénine, adénosine et AMP) après adsorption par IHN sur la saponite. La figure VI-12 présente les spectres IR d'adénine-sap (A / sap) et d'adénosine sap (Ads / sap).

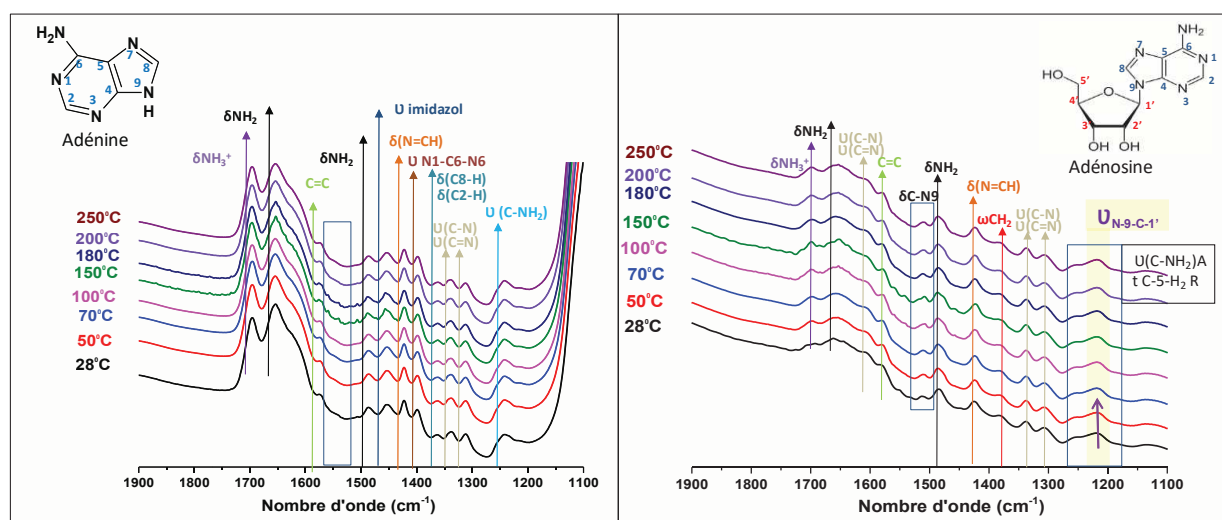


Figure VI-12 : Spectres FTIR des échantillons d'A/sap et d'Ads/sap soumis à une activation thermique sous vide, δ : bending mode, ω : wagging mode, ν : stretching mode.

Les spectres montrent la présence de plusieurs bandes caractéristiques de l'adénine et de l'adénosine. Leurs attributions sont ajoutées directement sur les spectres. Ces bandes ne présentent aucune évolution en fonction de la température jusqu'à 250°C (au moins). A titre de comparaison, l'adénine et l'adénosine massique sont thermiquement stables jusqu'à 360 et 235°C, respectivement. Cependant, on observe dans les deux cas des bandes caractéristiques de l'amine protonée et non-protonée à 1696 et 1654 cm^{-1} , respectivement. Très probablement, la protonation de l'adénine est favorisée parce qu'elle permet l'échange ionique par les cations ainsi formés. Mais la protonation de ce groupe fonctionnel de l'adénine ne peut donc pas être considérée comme une indication de sa glycosylation.

D'après ces spectres, seulement deux bandes de vibration nous permettent de différencier une adénosine d'une adénine. La première est caractéristique de la vibration d'élongation (ν) de la liaison de glycosylation (N9-C1'), elle apparaît à 1208 cm^{-1} . La deuxième apparaît à 1510 cm^{-1} et correspond à la vibration de déformation (δ) de la liaison C-N9.

La saponite est transparente sur une plage un peu plus large que celle de la silice, ce qui nous permet d'avoir plus d'information structurale. En plus, on observe l'apparition de la bande caractéristique des C=C à 1573 cm^{-1} . Rappelons que d'après la bibliographie et nos analyses sur la silice, les bandes caractéristiques de C=C et C=N de l'adénine apparaissent ensemble à 1606 cm^{-1} . La fixation du ribose sur le N9 de l'adénine provoque la stabilisation du cycle purique et permet par la suite de mieux distinguer les deux bandes C=N (1606 cm^{-1}) et C=C (1573 cm^{-1}). Cependant, ces bandes sont bien séparées dans le spectre d'A / sap, ce qui

indique que l'interaction de l'adénine avec l'argile peut à elle seule aboutir au même effet que la glycosylation.

La figure VI-13 présente les spectres de la référence d'AMP / sap et ceux de l'échantillon AR1P / sap.

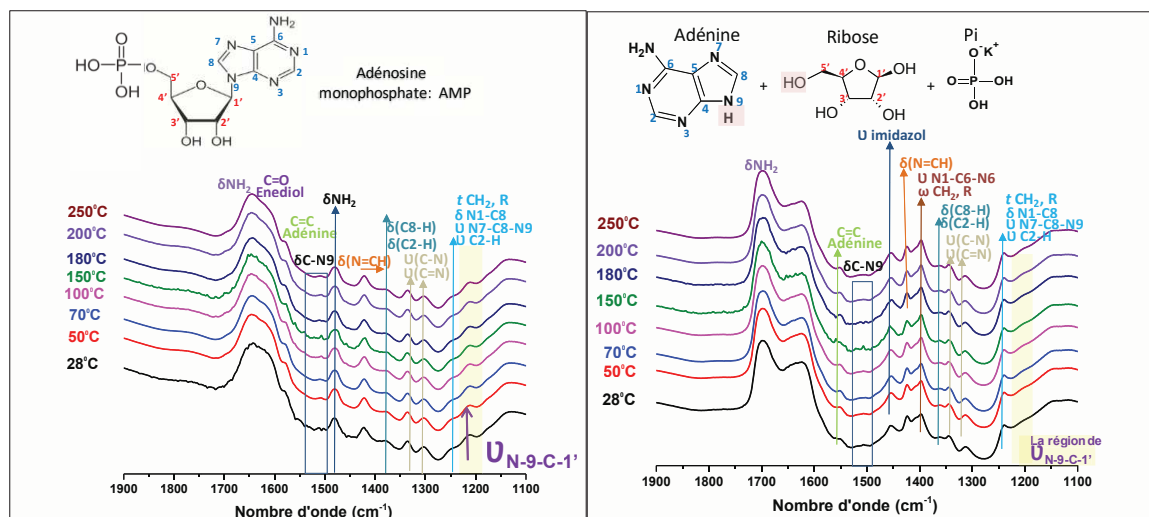


Figure VI-13 : Spectres FTIR des échantillons d'AMP / sap et de AR1P / sap soumis à une activation thermique sous vide, δ : bending mode, ω : wagging mode, ν : stretching mode, τ : twisting.

Les deux échantillons présentent des bandes caractéristiques des constituants de l'adénine et du ribose. Les attributions de ces bandes sont directement indiquées sur les spectres.

Le spectre d'AMP / sap nous montre la présence d'une faible bande caractéristique de ν N9-C1' tandis que la bande caractéristique de δ C-N9 n'est pas présente. Tout comme dans les échantillons RP /sap discutés plus haut, on n'a pas pu observer les bandes caractéristiques de la liaison ribose-phosphate (région non présentée).

Concernant l'échantillon AR1P / sap, on n'observe ni la bande caractéristique de δ C-N9 ni celles du ribose-phosphate. Il est difficile de déterminer avec certitude si la bande large observée dans la région ($1250-1150\text{ cm}^{-1}$) correspond à ν N9-C1' ou non. Par conséquent, la spectroscopie IR ne fournit que des réponses ambiguës sur la glycosylation de la base nucléique adsorbée sur saponite.

III. Analyse ^{31}P RMN (1pulse)

Les échantillons de AR1P / sap et d'AMP / sap ont été analysés par RMN de ^{31}P , 1 pulse. Les spectres obtenus sont comparés avec celui du phosphate massique et du Pi/sap dans la figure VI-14.

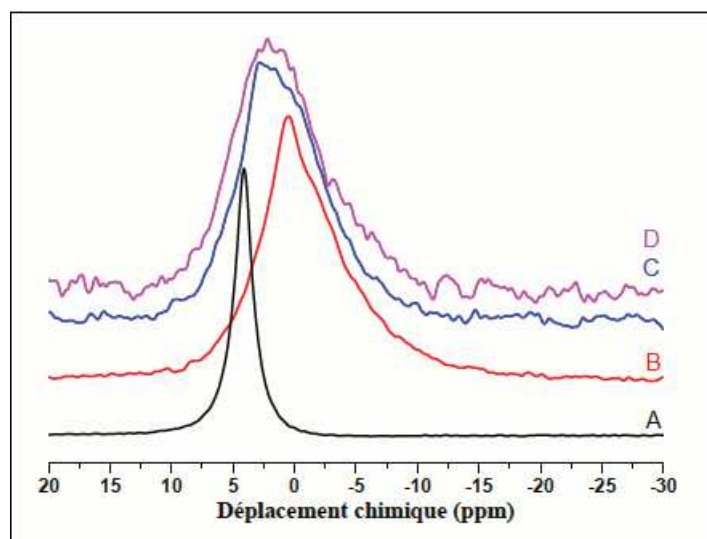


Figure VI-14 : Spectres RMN ^{31}P (1 pulse) du phosphate massique (A) et des échantillons 5% Pi / sap (B) ; 5% AMP / sap (C) et AR1P / sap (D).

La figure V-14 nous montre clairement que le profil de spectre de l'échantillon AR1P / sap est quasiment identique à celui de l'AMP / sap, mais différent de celui de Pi/sap. Les décompositions de ces spectres sont présentées dans la figure VI-15.

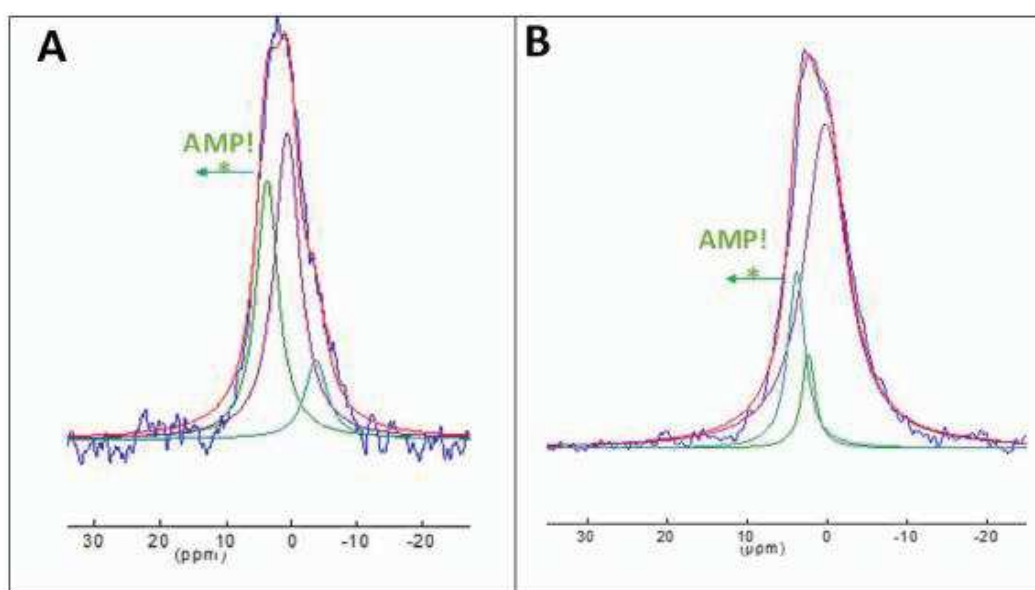


Figure VI-15 : Décomposition des spectres RMN de ^{31}P des échantillons d'AMP / sap (A) et AR1P / sap (B).

Les deux décompositions montrent la présence d'un pic caractéristique de l'AMP à 3,9 ppm. Donc, par co-adsorption de ses trois constituants sur la saponite, de l'AMP semble bien s'être formé.

IV. Analyse MALDI

L'échantillon de AR1P / sap a été soumis à désorption et la solution aqueuse obtenue analysée en spectrométrie de masse. Le résultat est présenté ci-dessous dans les figures VI-16 et VI-17.

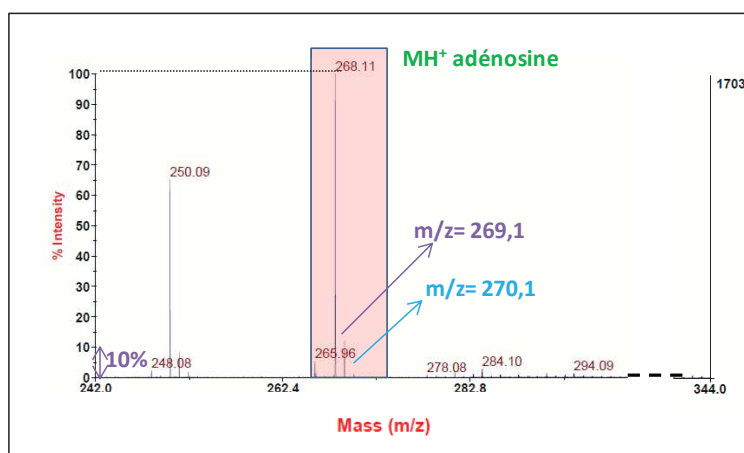


Figure VI-16 : SM MALDI effectué en mode positif d'ARP/sap.

Rappelons que la référence d'adénosine, précédemment présenté dans le chapitre 4, présente un pic caractéristique en analyse MALDI-mode positif à $m/z = 268,1$ uma. La détection d'un pic à $m/z = 268,11$ confirme donc la présence d'adénosine dans l'échantillon de AR1P / SiO₂, analysé dans les mêmes conditions. En plus de ce pic, on observe ses deux autres isotopes à $m/z = 269,1$ et $m/z = 270,1$ avec à chaque fois une intensité égale à 10% de celle de l'isotope précédent. Cette isotopie correspond à celle qui est attendue pour une molécule à 10 atomes de carbone comme l'adénosine : en effet, la probabilité d'observer une molécule d'adénosine contenant un atome de ¹³C est approximativement égal à 10 fois l'abondance isotopique naturelle du carbone, qui vaut environ 1%.

La deuxième partie du spectre est présentée dans la figure VI-17.

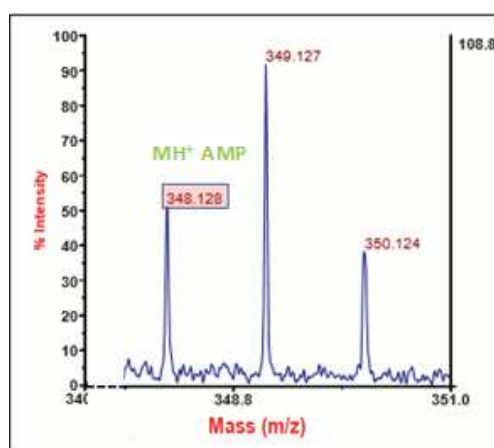


Figure VI-17 : SM MALDI effectué en mode positif de ARP / sap, région 340-351 uma

Par comparaison avec la référence d'AMP, la présence de celle-ci est confirmée dans notre échantillon par le pic à $m/z=348,12$. Cependant, la présence de deux pics intenses à $m/z=249,12$ et $m/z=250,12$ nous empêche de confirmer la présence des isotopes de l'AMP.

Donc le résultat obtenu par analyse MALDI est cohérent avec l'analyse RMN de ^{31}P sur le même échantillon : on a bien formation d'AMP. Le MALDI indique aussi la formation d'une quantité importante d'adénosine, qui est bien sûr indétectable par RMN de ^{31}P .

F. Discussion générale

D'après cette étude on a pu constater que le ribose et le phosphate n'ont pas le même comportement d'adsorption sur la saponite. La DRX nous montre que le ribose s'intercale au moins partiellement entre les feuillets d'argile. Le dépôt de dihydrogénophosphate de potassium résulte en un échange du sodium interfoliaire par du potassium ; il n'y a aucune indication que les ions phosphates soient intercalés, et on peut donc supposer qu'ils interagissent plutôt avec les groupes de bord de l'argile. Cela est d'ailleurs logique car l'interaction électrostatique serait défavorable entre les anions phosphates et les feuillets argileux chargés négativement. Lorsque ribose et phosphate sont co-adsorbés, ces préférences ne changent pas et il est donc probable qu'une partie au moins des molécules de ribose soient situées dans un compartiment, l'espace interfoliaire, où il n'y a pas de phosphates.

Cette intercalation a pu stabiliser thermiquement le sucre jusqu'à 250°C , ce qui est nettement plus élevé que sur silice ($250^\circ\text{C}/\text{saponite}$ vs $150^\circ\text{C}/\text{silice}$). L'adénine et l'adénosine apparaissent également extrêmement stables thermiquement en présence de la matrice saponite, ce qui est un facteur positif pour son emploi dans des scénarios prébiotiques.

Notre objectif principal était l'étude des réactions de glycosylation et de phosphorylation sur la saponite. Les résultats de RMN, mais surtout de spectrométrie de masse après désorption, ont montré la capacité de cette argile à favoriser ces deux réactions en aboutissant à la formation de ribose 5'phosphate, d'adénosine et d'AMP. Ces réactions semblent même avoir un rendement plus élevé que sur silice. Le mécanisme n'est sans doute pas le même puisque par exemple, nous n'avons pas d'indice sur la saponite de passage par la forme PRPP, que nous avons postulée comme intermédiaire réactionnel sur la silice. Les résultats sont donc encore préliminaires mais très encourageants, d'autant plus qu'un séchage à température modérée semble suffisant pour induire ces réactions, sans qu'il soit besoin d'activer dans des conditions de température sévères.

Références bibliographiques

1. (a) Izawa, M.; Nesbitt, H.; MacRae, N.; Hoffman, E., Composition and evolution of the early oceans: evidence from the Tagish Lake meteorite. *Earth and Planetary Science Letters* **2010**, *298* (3), 443-449; (b) Nakamura, K.; Zolensky, M. E.; Tomita, S.; Nakashima, S.; Tomeoka, K., Hollow organic globules in the Tagish Lake meteorite as possible products of primitive organic reactions. *International Journal of Astrobiology* **2002**, *1* (03), 179-189; (c) Bunch, T.; Chang, S., Carbonaceous chondrites—II. Carbonaceous chondrite phyllosilicates and light element geochemistry as indicators of parent body processes and surface conditions. *Geochimica et cosmochimica acta* **1980**, *44* (10), 1543-1577.
2. Jaber, M.; Miéché-Brendlé, J., Influence du milieu de synthèse sur la cristallisation de saponite: proposition de mécanisme réactionnel en milieux acide et basique. *Comptes Rendus Chimie* **2005**, *8* (2), 229-234.
3. Drits, V.; Tchoubar, C.; Klimanek, P., X-ray diffraction by disordered lamellar structures. Theory and Applications to Microdivided Silicates and Carbons. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1990, 371 Seiten mit 156 Abbildungen. 30 Tabellen und ca. 250 Literaturzitaten, Preis: 268,-DM. *Crystal Research and Technology* **1991**, *26* (7), 956-956.
4. Jaber, M.; Bouchoucha, M.; Delmotte, L.; Méthivier, C.; Lambert, J.-F. o., Fate of L-DOPA in the presence of inorganic matrices: vectorization or composite material formation? *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (39), 19216-19225.
5. Darder, M.; Ruiz-Hitzky, E., Caramel-clay nanocomposites. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15* (35-36), 3913-3918.

Discussion générale

VII. Discussion générale

Jusqu'à présent, peu d'études portent sur le travail en absence des activateurs chimiques et aucune étude n'a décrit la synthèse *in-situ* des nucléotides. Dans ce contexte, notre travail présente une première étude *in-situ* de la réactivité thermique des "briques élémentaires" des nucléotides adsorbées sur des surfaces minérales. Il ne s'agissait pas seulement d'analyser la composition finale des produits obtenus mais aussi de comprendre la réactivité molécule-interface afin de déterminer l'influence de chaque surface minérale utilisée.

L'ensemble de mon travail a montré dans un premier temps que, d'une part, les surfaces minérales sont capables de catalyser la condensation de phosphates inorganiques à des températures modérées en formant des molécules à haute énergie libre. D'autre part, l'adsorption du ribose sur la surface de la silice a permis d'améliorer sa stabilisation thermique et moléculaire. Par conséquent, on pourrait augmenter la température d'activation thermique de 90°C (en milieux aqueux) jusqu'à 150°C et même 200°C (en présence de ZnCl₂) après adsorption sur la surface de la silice, tout en restant pertinent du point de vue de la stabilité des molécules.

Ces résultats soulignent donc un double avantage des surfaces minérales par rapport aux réactions prébiotiques de synthèse des nucléotides, ce qui nous a encouragés à poursuivre l'étude.

Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence la formation de PRPP avec une régiosélectivité importante pour les carbones C1' et C5' du ribose, par co-adsorption du ribose avec du phosphate inorganique sur la surface de la silice. Le PRPP est un intermédiaire réactionnel très important, il intervient dans le métabolisme contemporain dans la synthèse des nucléotides et n'avait jamais été formé *in-vitro* jusqu'à présent. Ce résultat est particulièrement intéressant si on le met en relation avec le travail de Sponer qui a montré que l'ajout d'un groupement diphosphate en position C1' rend le ribose réactif lors de la glycosylation d'une base azotée. Ainsi, notre travail présente un premier modèle de synthèse *in-vitro* de PRPP et par là même un premier pas vers la formation des nucléotides.

Avant de complexifier le système, on a étudié la réactivité thermique du ribose en présence de l'adénine sur la surface de la silice. Le résultat obtenu a montré la formation de l'adénosine à 70°C avec un rendement quatre fois plus élevé que celui d'Orgel en milieu aqueux.

Ensuite, nous avons étudié *in-situ* (RMN, IR, DRX, ATG-TD) et après désorption (SM) la réactivité thermique des trois « briques élémentaires" de l'AMP (adénine, ribose, phosphate)

après co-adsorption sur la surface minérale (la silice ou la saponite). Au niveau moléculaire, la technique qui donne les indications les plus claires *in situ* est la spectroscopie RMN de ^{31}P à l'état solide, qui avait déjà montré avec succès la formation de PRPP à partir de ribose et de phosphate. La spectroscopie MALDI a confirmé les résultats obtenus en identifiant les molécules présentes dans la solution aqueuse obtenue par désorption. L'ensemble des analyses effectuées indique la formation d'AMP sur la surface de la silice, et sur les bords de feuillets dans le cas de la saponite. Ce résultat valorise encore une fois notre choix « chimie prébiotique sur des surfaces minérales ». L'effet des surfaces minérales est double.

- Elles permettent tout d'abord de fournir un milieu où les molécules précurseurs des nucléotides peuvent réagir en conditions de faible activité de l'eau, ce qui est nécessaire thermodynamiquement pour réaliser les réactions de synthèse des nucléotides comme l'AMP : en effet, ces réactions sont des condensations qui forment H_2O comme produit, et d'après la loi de Le Châtelier la diminution de l'activité des produits déplace l'équilibre correspondant vers la droite.

- Elles servent aussi de catalyseurs inorganiques capables de concentrer les molécules en conservant une certaine mobilité qui permet leur rencontre et par la suite leur interaction. Très probablement, certains sites de surface comme les groupements silanols activent spécifiquement l'un ou plusieurs des réactifs de façon à abaisser l'énergie d'activation de la condensation : de la sorte, la synthèse peut se produire dans des conditions moins sévères que par exemple pour un mélange de phases solides non supportées.

Dans la suite du travail, nous avons étudié la réactivité thermique du couple (AMP-UMP) sur la surface de la silice afin d'obtenir une chaîne de nucléotides plus longue. Cette étude est encore préliminaire et est confrontée par des limitations analytiques (RMN, FTIR). Cependant, l'analyse de la solution de désorption de l'échantillon activé à 180°C montre la dimérisation des nucléotides. Ainsi, ces analyses ont témoigné la dismutation de l'AMP et celle de l'UMP.

Le principal problème auquel sont confrontés les chercheurs dans leur étude de la formation des nucléotides ou leur condensation en milieu aqueux est la présence de l'eau et la nécessité d'avoir des activateurs chimiques si l'on veut réaliser des réactions de condensation en phase aqueuse (ce point est détaillé dans l'introduction générale et le chapitre I). Les surfaces minérales utilisées dans notre étude ont permis une forte diminution de la fraction d'eau dans le milieu réactionnel.

Or toute réaction de condensation - que ce soit entre deux phosphates, entre un phosphate et un C-OH d'un sucre, entre un C-OH et le N-H d'une base nucléique, peut s'écrire comme



$$\text{avec } K = \frac{a_{XY} a_{H_2O}}{a_X a_Y} \text{ (équation 1)}$$

de sorte que, pour assurer la constance du quotient réactionnel à l'équilibre, une diminution de l'activité de l'eau (a_{H_2O}) doit être compensée par une augmentation du rapport ($a_{XY} / a_X a_Y$), favorisant ainsi la molécule condensée.

Plus en détails, sur un système analytiquement simple comme le phosphate, nous avons pu montrer la présence de diphosphates après séchage à 70°C sur la silice et la saponite. De même, la formation de PRPP, d'adénosine et d'AMP indique que les réactions de condensation sont effectivement plus favorisées dans nos conditions qu'en solution aqueuse.

Pour que les réactions de condensation se produisent effectivement, il faut d'abord qu'elles soient thermodynamiquement possibles, mais cela ne suffit pas : il faut encore que leur cinétique soit assez rapide dans les conditions étudiées. Le dépôt sur la surface active les différentes molécules étudiées puisque, par exemple, la condensation des phosphates se produit à basse température dans les systèmes Pi/SiO₂, mais pas dans les phosphates massiques, bien qu'ils soient anhydres ! Cette activation implique une interaction avec les groupes de surface comme les silanols associés (Si-OH), mais aussi avec l'eau coadsorbée. En effet, on peut penser que les molécules initiales doivent rester suffisamment mobiles pour pouvoir interagir et produire des nouveaux composés.

A partir de tous ces résultats, on constate que l'eau a joué deux rôles importants, sans doute antagonistes dans notre système réactionnel :

- 1- Le rôle thermodynamique : En déplaçant la réaction vers la droite (la condensation), ce qui nécessite une faible activité de l'eau.
- 2- Le rôle cinétique : En préservant une certaine mobilité des espèces permettant d'augmenter leur probabilité de rencontre, ce qui doit nécessiter au contraire une activité relativement élevée de l'eau.

Alors, la faisabilité des réactions de condensation sur des surfaces minérales est directement liée à l'activité de l'eau. Celle-ci doit être optimale pour pouvoir équilibrer entre son effet cinétique et son effet thermodynamique.

Notons aussi que la présence des produits de condensation dans les solutions de désorption indique que l'eau à température ambiante ne parvient pas à hydrolyser à température ambiante les liaisons formées par activation thermique modérée. Or si les surfaces catalysent la condensation, elles doivent aussi catalyser la réaction inverse d'hydrolyse.

En tout cas, nous avons réussi à atteindre notre objectif principal par formation d'AMP en absence d'activateurs chimiques et en une réaction one pot sur la surface de la silice et les bords de la saponite avec une sélectivité jamais observée auparavant. Cette sélectivité est très importante du point de vue prébiotique parce qu'elle permet d'obtenir des produits d'intérêts biologiques sans passer par une étape de protection de groupements fonctionnels. Si cette sélectivité est impressionnante, il reste à l'expliquer et cela est une des perspectives du projet. Notons que ces surfaces ont aussi permis la condensation de phosphate à basse température, la stabilisation moléculaire du ribose et la formation de PRPP. Concernant la formation d'adénosine, celle-ci est favorable en solution cependant dans notre système le rendement a été augmenté d'un facteur 4.

L'AMP est l'un des monomères constituant l'ARN tandis que l'ATP (adénosine triphosphate) est la source d'énergie des réactions chimiques (métabolisme, division cellulaire, ...) de tous les êtres vivants. Dans ce contexte, il est intéressant de souligner des études déjà effectuées dans notre équipe qui permet la formation d'ATP à partir de l'AMP sur la surface de la silice. En effet, Georgelin et al. ont mis en évidence la formation de l'ADP et ATP par un mécanisme de dismutation de l'AMP après sa simple adsorption sur la surface de la silice. En plus de cette dismutation ils ont pu phosphoryler l'AMP en ADP et ATP après son co-adsorption avec du phosphate inorganique (KH_2PO_4). Ce résultat montre donc la possibilité de formation d'ATP sur la surface de la silice par deux étapes, d'abord la formation d'AMP à partir de ses trois composants et ensuite sa phosphorylation en ATP.

Dans ce travail on a voulu explorer l'hypothèse du monde ARN. Dans le cadre de ce scénario, la formation d'un seul monomère n'est que le début de la route qui pourrait nous amener à la formation d'oligonucléotides et ensuite à l'ARN. Notre étude d'oligomérisation d'AMP sur la surface de la silice montre la formation d'un dimère d'AMP après activation thermique à 180°C. Ce résultat indique alors la faisabilité de la réaction sur la surface minérale utilisée.

Cependant, cette étude reste préliminaire, elle nécessite une poursuite et une optimisation plus profonde des paramètres expérimentaux (température, pH, mobilité, présence des sels). L'optimisation de ces paramètres doit être effectuée sur un système simple. En effet, le suivi *in situ* de l'oligomérisation d'AMP dans le système (Adénine + ribose + phosphate) est compliqué analytiquement non seulement à cause du faible rendement de la réaction mais aussi à cause du nombre d'espèces présents sur la surface. Plus précisément, dans ce milieu on a de l'adénine, de l'adénosine, de l'AMP, du ribose et peut être aussi du ribose phosphorylé ce qui complexifie le système étudié. Plus le degré de complexité du système augmente, plus on aura d'espèces sur la surface et plus la détection deviendra difficile, surtout par les techniques *in situ*. Par exemple en spectroscopie RMN ou IR, le nombre de pics et/ou de bandes de vibration sera de plus en plus important et les pics et/ou bandes deviendront moins intenses et difficiles à résoudre. Pour dépasser ce problème, on peut simplifier le système en étudiant et optimisant la réactivité d'AMP pur déposé sur silice. Cela est plus facile bien sûr, mais est-ce prébiotiquement raisonnable ? Il faudrait postuler qu'avec le temps l'AMP formé se concentre sur la surface minérale ce qui permet d'augmenter le rendement d'oligomérisation. Cette hypothèse permet alors de passer de l'étape 1 (formation d'AMP à partir d'adénine, ribose et phosphate) à l'étape 2 (optimisation des paramètres expérimentaux d'oligomérisation d'AMP/surface minérale).

En outre, la difficulté d'interprétation rencontrée lors de l'étude préliminaire d'AMP / silice nous incite à analyser les molécules formées en surface par des étapes de désorption suivies d'analyses en solutions aqueuses, notamment par HPLC et spectrométrie de masse. Ceci ajoute un autre travail important qui est l'étude de la désorption des oligomères : seront-ils en forte interaction avec la surface utilisée, auquel cas il faudra optimiser l'étape de désorption ? Cette étape risque-t-elle de les modifier puisqu'ils se retrouveront forcément dans une phase où ils sont thermodynamiquement instables ? Les réponses à ces questions ne sont pas évidentes et nécessitent un travail expérimental dédié.

Pour conclure sur l'avantage des surfaces minérales par rapport au travail en solution, comme Bernal le proposait, elles permettent de diminuer l'activité de l'eau, de concentrer les molécules et donc de dépasser l'écueil lié à la condensation « l'eau ».

L'originalité de ce travail réside dans le fait d'étudier *in-situ* la réactivité des molécules adsorbées sur des surfaces minérales, y compris sans passage par une étape de désorption qui pourrait changer les équilibres et provoquer une hydrolyse des liaisons formées. Les outils analytiques utilisés nous ont permis d'intégrer de nouvelles techniques de caractérisation dans la communauté des exobiologistes, la RMN et l'IR *in-situ*. Il nous a été aussi possible de

poser un nouveau regard sur les études réalisées précédemment (Orgel et Ferris...) permettant ainsi de montrer et valoriser l'effet des surfaces minérales sur les réactions de condensation prébiotique.

Tout en soulignant l'originalité de ce travail, il est indispensable aussi de discuter quelques points faibles. Notre méthodologie pourrait être accusée d'un manque de pertinence par rapport à la réalité géochimique de l'environnement prébiotique. D'abord, on a utilisé un ou des rapports stœchiométriques déterminés dans notre travail, or un faible changement de ce rapport peut modifier l'équilibre. A ce propos, on peut imaginer une surface minérale qui reçoit et concentre des molécules organiques au cours du temps. Une fois le rapport stœchiométrique "convenable" obtenu, les réactions peuvent avoir lieu. En plus, les traitements thermiques en IR ont été effectués dans un montage soumis à un vide secondaire au lieu d'une atmosphère qui reflète la composition atmosphérique prébiotique (H_2S , CO_2 , ...). De même, le suivi de la réactivité a été effectué par co-adsorption des constituants de nucléotides sans prendre en considération la possibilité d'avoir d'autres produits sur la surface minérale comme des sels ou d'autres produits organiques qui auraient été certainement présents dans des conditions "réalistes". En effet, on ne pouvait pas commencer l'étude par un système complexe contenant plusieurs espèces. Il fallait aller du plus simple au plus complexe. Par exemple, des essais ont été effectués sur la réaction de phosphorylation en présence de sels inorganiques mais les résultats RMN de ^{31}P étaient très compliqués et difficiles à interpréter.

En ce qui concerne le choix des minéraux, la silice amorphe est un bon système modèle de cherts et permet d'étudier l'impact des silanols sur les réactions prébiotiques. Leur présence est cependant moins répandue sur la Terre primitive en comparaison à d'autres minéraux (sulfure, argiles,..). Le choix de la silice amorphe était lui aussi basé sur un impératif de simplicité, simplicité de caractérisation mais aussi simplicité de la surface qui permet de déterminer l'effet des silanols, présents aussi dans les argiles, et de complexifier peu à peu le système.

Une autre limitation s'ajoute à notre système, liée au fait que nous postulons la présence conjointe du sucre et de la base azotée. Cela n'est pas acquis dans la mesure où les précurseurs de la base et du sucre sont différents. Il est essentiel maintenant de déterminer l'influence des différentes surfaces minérales sur la formation des monomères (sucre et bases) et d'identifier si ils peuvent être présents conjointement à leurs surfaces.

Enfin, des limitations analytiques nous empêchent de mimer l'environnement prébiotique (présence de sels, d'ions paramagnétiques, formation de complexe de coordination). La quantité des produits formés dans des conditions géochimiques réalistes seront vraisemblablement nombreux et leur caractérisation sera très spéculative, c'est pourquoi il a été choisi d'étudier successivement différents paramètres expérimentaux afin de simplifier le système à chaque étape.

Perspectives

VIII. Perspectives

Le travail exposé dans les chapitres précédents présente la synthèse d'AMP sur deux surfaces minérales (la silice et la saponite) dans des conditions simples qui semblent réalistes par rapport à l'environnement primitif.

Nous avons en fait commencé à explorer d'autres pistes, correspondant à d'autres systèmes qui auraient pu être présents dans l'environnement primitif. Ces études ne sont pas assez abouties pour faire l'objet de chapitres séparés, mais nous avons jugé utile de présenter ici les premiers résultats obtenus, qui pourront constituer la base d'études ultérieures plus complètes.

Ainsi, nous avons lancé une série d'études impliquant d'autres surfaces minérales (sulfure de cuivre, montmorillonite) et d'autres conditions de la Terre primitive (effet des rayonnements UV, effets de la présence des sels).

I. Réactivité sous rayonnement UV

Nous avons commencé à étudier l'effet de l'exposition du ribose aux rayonnements UV. Les deux échantillons (ribose massique, ribose/SiO₂) ont été soumis à différentes durées d'exposition (0, 5, 15, 30 min 3h et 1 nuit) au rayonnement produit par une cellule d'irradiation UV de 190 nm. Il s'agit donc d'UV énergétiques. Après exposition, des pastilles autosupportées de ces échantillons ont été analysés par FTIR sous vide. Dans le cas du ribose massique, on a préparé des pastilles par dilution dans le KBr, tandis qu'avec le ribose/SiO₂ on a réalisé des pastilles autosupportées. Les spectres obtenus sont présentés à la figure 1.

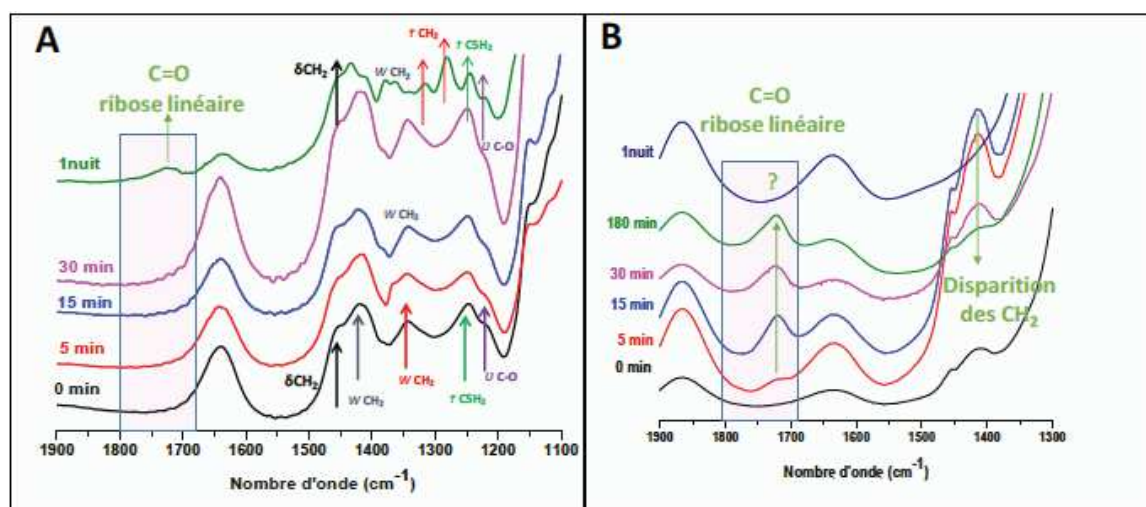


Figure 1 : Spectres FTIR de ribose-KBr (A) et ribose /SiO₂ (B) après exposition UV durant 0, 5, 10, 15, 30, 180 min et 1 nuit. δ : bending ; ν : stretching ; ω : wagging.

On remarque immédiatement que le ribose/SiO₂ est moins stable que le ribose massique sous rayonnement UV. En effet, l'ouverture du cycle est détectée dans l'échantillon ribose/SiO₂ dès 5 min d'exposition tandis qu'aucun changement n'est détecté dans le spectre du ribose massique pendant la même durée. En irradiant plus longtemps les deux échantillons, on constate que le ribose massique est stable jusqu'à 30 min d'exposition et qu'une ouverture de cycle commence à être observable seulement après une nuit d'irradiation. D'autre part, l'augmentation de la durée d'exposition de l'échantillon de ribose/SiO₂ jusqu'à 180 min se traduit par la diminution de la bande ω_{CH_2} et l'augmentation de celle du ribose linéaire. Après une nuit d'irradiation, ces deux bandes disparaissent. L'analyse thermique (ATG-TD) de cet échantillon (ribose/SiO₂, 1 nuit UV) nous a confirmé l'absence de toute matière organique.

Même si la formation du ribose linéaire est importune parce qu'elle rend le sucre plus susceptible à la dégradation, elle pourrait permettre aussi d'augmenter sa réactivité vis-à-vis des réactions de condensation. Pour cette raison, on a étudié l'effet de l'exposition UV sur la phosphorylation du ribose après co-adsorption du sucre avec du phosphate inorganique sur la surface de la silice. Un échantillon de 5% Rib + Pi (1 :1) /SiO₂ a été irradié pendant 30 et 180 min et analysé par RMN solide du phosphore. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 2. Le Tableau 1 résume les positions des composantes d'intérêt et leurs intensités relatives.

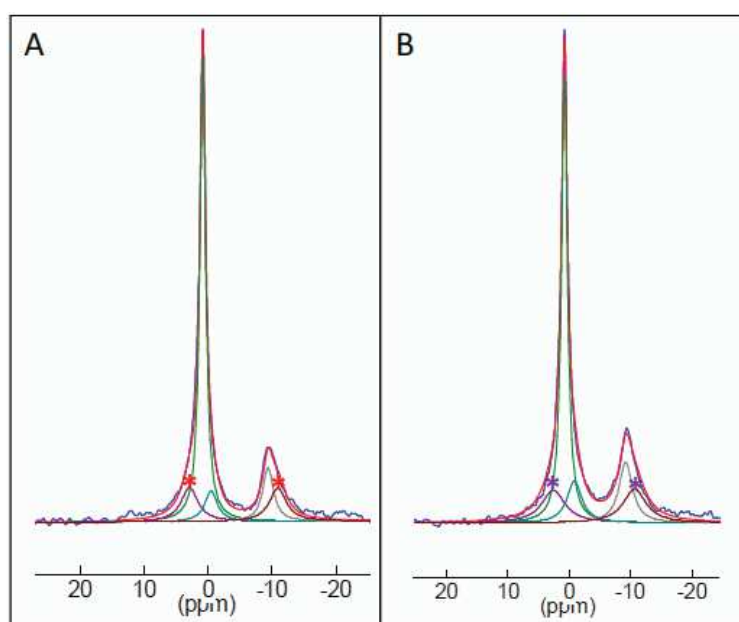


Figure 2 : Décomposition des spectres RMN de ³¹P de l'échantillon de 5% Rib + Pi (1 :1) / SiO₂ après 30 min (A) et 180 min d'exposition aux rayonnements UV.

Tableau 1 : position et contribution relative des différents signaux RMN de ³¹P dans les échantillons de 5% R1P / SiO₂ après 0, 30 et 180 min d'exposition aux rayonnements UV.

5% Rib +Pi (1 :1)/SiO₂	δ (ppm)	% en phosphore/%total	Largeur (ppm)
0 min UV	2,85	8,2	3,15
	-10,3	7,6	3,15
30 min UV	2,89	12,0	3,19
	-10,95	11,6	3,18
180 min UV	2,83	13,6	4,60
	-10,4	13,8	4,50

Les deux spectres montrent la présence des deux pics caractéristiques de PRPP, le premier vers 2,9 ppm (Rib5'P) et le deuxième vers -10,5 ppm (diphosphate-C1'). Ces deux pics présentent dans chaque spectre la même largeur à mi-hauteur et le même % relatif en phosphore ce qui confirme que tous les deux appartiennent au même composé qui est le PRPP. Donc, même en irradiant l'échantillon durant 30 ou 180 minutes, on observe toujours du PRPP.

En fait, la quantité relative de PRPP (par rapport au phosphore total) augmente de 7,9% (avant exposition) à 11,8 et 13,7 % respectivement après 30 et 180 min d'exposition. Cela signifie qu'une partie des phosphates continuent de réagir sous irradiation à température ambiante : en effet, les phosphates ne sont pas détruits par irradiation, et donc une augmentation de la quantité relative de PRPP implique une augmentation de sa quantité absolue.

Il est possible que l'ouverture du cycle du ribose causée par l'irradiation de l'échantillon facilite la phosphorylation. En tout état de cause, le PRPP n'est pas sensiblement détruit par l'irradiation, contrairement au ribose. On pourrait donc avoir une concentration progressive du produit phosphorylé, par destruction sélective du ribose non réagi, ce qui est potentiellement intéressant pour un scénario prébiotique.

Il serait bien sûr opportun d'étudier aussi la stabilité d'adénosine/SiO₂, d'adénine/SiO₂, de R5'P/SiO₂ ainsi que les réactions de phosphorylation et de glycosylation dans un environnement exposé à l'irradiation UV, d'autant plus que la bibliographie (chapitre 1) rapporte un rôle positif des bases azotées pour la protection du sucre de l'irradiation UV dans le squelette des nucléotides et nucléosides.

Il serait peut-être important d'étudier l'effet d'une irradiation UV appliquée lors de la préparation par IHN des échantillons. Dans ce but, je propose un montage qui pourrait nous fournir un environnement soumis en même temps à une activation thermique et une irradiation UV. Ce montage est présenté dans la figure 3.

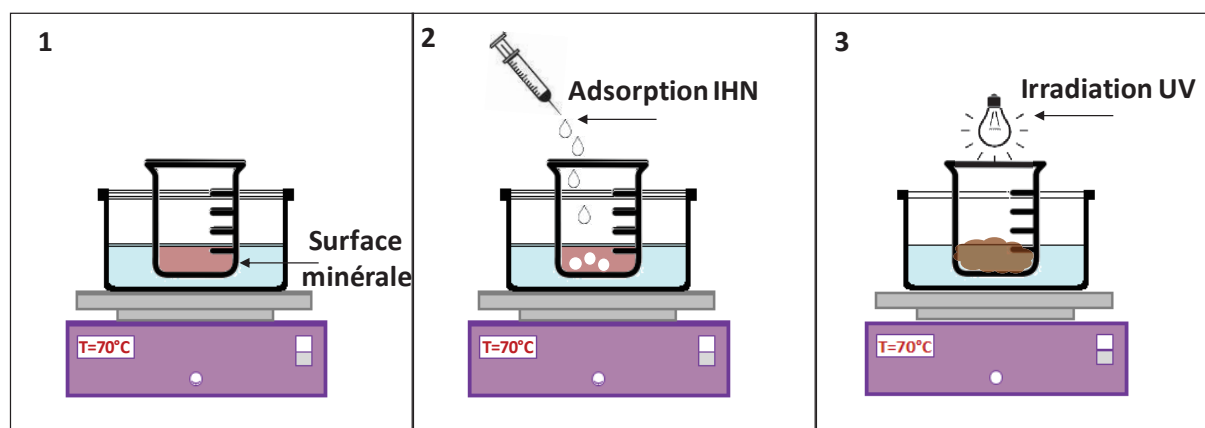


Figure 3 : Schéma représentatif d'un montage permettant d'étudier l'effet d'exposition aux rayonnements UV à une température précisément déterminée.

Dans cette étude on peut utiliser un bain-marie, par exemple une plaque chauffante portant un cristalliseur contenant de l'eau. D'abord on règle la température à la valeur souhaitée (1). On pourra ainsi effectuer plusieurs études à différentes températures (de 70°C jusqu'à 250°C). Puis on introduit dans le bain-marie un bécher ou bien un tube contenant la phase minérale étudiée (1). Ensuite, on ajoute goutte à goutte la solution d'imprégnation afin d'effectuer une adsorption par IHN (2). Après la formation d'un gel, on place une lampe UV juste au-dessus du bécher (3) et on laisse l'échantillon soumis à une activation thermique et une exposition aux UV durant une durée suffisante pour sécher le gel formé.

II. Réactivité en présence de sels inorganiques

Dans la continuité de l'étude de la réactivité thermique du ribose en présence des sels, j'ai commencé à étudier les réactions de phosphorylation du ribose et de glycosylation de l'adénine en présence de sels inorganiques. D'abord, j'ai étudié la réaction de phosphorylation en co-adsorbant le ribose avec du phosphate inorganique (KH_2PO_4) en présence de 1 équivalent molaire de sels inorganiques (CaCl_2 , SrCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2). Ensuite, j'ai analysé ces échantillons par RMN du phosphore. Les spectres obtenus étaient très complexes et il me paraît difficile de les analyser. En effet, on peut former différents types de complexes tant du phosphate que de ses produits de réaction avec les ions présents dans le milieu. La complexité du système pourrait être réduite si, au lieu d'utiliser ces types de sels, on évitait la présence de potassium et de chlorure en utilisant directement des phosphates inorganiques contenant ces

métaux, par ex : CaHPO_4 , MgHPO_4 , SrHPO_4 et ZnHPO_4 . Bien sûr, on pourrait aussi mettre l'accent sur le développement de techniques analytiques permettant l'analyse des mélanges complexes obtenus, ce qui nécessite probablement d'intégrer une étape séparative, par exemple HPLC + SM.

Dans un deuxième temps, j'ai étudié la réaction de glycosylation en présence des sels inorganiques précédemment cités. De même j'ai préparé les échantillons par co-adsorption IHN. Ensuite, j'ai effectué un suivi thermique par FTIR sous vide entre Ta et 250°C. Les résultats obtenus ne permettent pas de confirmer la glycosylation, a fortiori de faire des calculs de rendements et de les comparer avec celui de l'échantillon de (ribose+ adénine) / SiO_2 . En se basant à la présence des sels sur la Terre primitive et sur le rôle des métaux dans la structuration de l'ARN, je pense néanmoins qu'il est important de poursuivre l'étude de la glycosylation en présence des sels inorganiques et par la suite d'étudier la formation d'AMP dans ces mêmes conditions.

En plus de l'effet du rayonnement UV et de la présence des sels inorganiques, il sera aussi intéressant d'étudier l'effet du pH sur la stabilité de la matière organique et sur la cinétique des réactions de condensation. Plus précisément, on pourra adsorber des solutions préparées à différents pH sur la surface minérale étudiée. Ensuite, on pourra prolonger cette étude en effectuant des suivis thermiques à chaque pH étudié.

Pour mieux explorer l'hypothèse du monde ARN, je propose aussi d'étudier la synthèse d'autres types de nucléotides sur différentes surfaces minérales et dans différentes conditions. De même, il serait intéressant de prolonger l'étude d'oligomérisation des nucléotides sur les surfaces minérales en jouant sur les conditions expérimentales (pH, présence de sels, température, type de surface utilisé) et en analysant les échantillons après désorption par spectrométrie de masse.

III. Réactivité sur une montmorillonite : phosphates et ribose

Le travail présenté dans le manuscrit comprend les études effectuées sur la silice amorphe et sur la saponite. Cependant, on a prolongé cette étude et on a commencé à travailler sur d'autres surfaces minérales, prébiotiquement pertinentes, à savoir le sulfure de cuivre et la montmorillonite. Le travail sur le sulfure de cuivre (de structure covellite) se situe dans le cadre du projet de recherche de Thomas Georgelin. La synthèse et la caractérisation de ces matériaux ont été effectuées au LRS. Les résultats obtenus ont montré la formation du ribose phosphorylé, d'adénosine et d'AMP après co-adsorption par IHN des briques élémentaires

(ribose, KH_2PO_4 , adénine). La deuxième surface minérale utilisée est celle de la montmorillonite. Elle a également été synthétisée et caractérisée au LAMS. Les études préliminaires effectuées montrent que c'est une surface hautement catalytique pour la condensation de phosphates puisque ceux-ci sont formés en grande quantité dès un séchage à 70°C (le pourcentage relatif en diphosphates est 70%), figure 4.

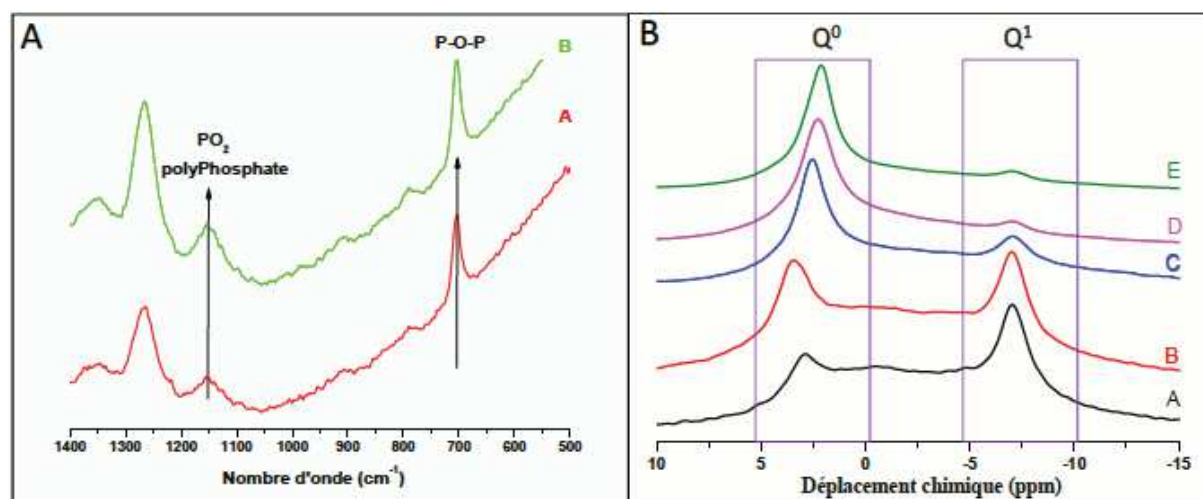


Figure 4 : A- analyse Raman de x % Pi/Mt 0.4 avec $x= 10\%$ (A), 15% (B) ; B- Spectres RMN de ^{31}P , 1 pulse de x % Pi-Mt, avec $x= 5\%$ (A), 10% (B), 15% (C), 20% (D) et 25% (E).

La figure 4 (A) présente les spectres Raman des échantillons 10 et 15% Pi / Mt. Ces spectres montrent la présence des deux bandes de vibrations (P-O-P et PO_2) caractéristiques de la présence de polyphosphates. La figure 4 (B) présente la RMN de ^{31}P de Pi/Mt à différents % massiques. Les monophosphates adsorbés sont observés à 2,3 ppm. A faible densité surfacique en phosphates, on observe une très forte proportion en phosphates Q^1 , caractéristiques des diphosphates, après séchage à 70°C seulement. Le pourcentage de diphosphates a été évalué à environ 70 % pour une charge de 5% en phosphates. Plus la charge augmente, plus cette proportion de diphosphates diminue jusqu'à une valeur inférieure à 10 %. Ceci va apparemment à l'encontre de la thermodynamique qui nous amènerait à attendre le résultat inverse puisque la densité de surface augmente en proportion. Une explication possible est qu'il existe un nombre limité de sites spécifiques, par exemple sur les bords des argiles. Ces sites particuliers pourraient favoriser la formation de diphosphates, soit pour des raisons thermodynamiques (un diphosphate étant plus fortement adsorbé que deux diphosphates), soit pour des raisons cinétiques (l'activation des phosphates par adsorption sur ces sites catalysant leur dimérisation). En augmentant la charge de phosphates, les sites spécifiques sont saturés et l'adsorption se fait sur d'autres sites, ne présentant pas le même effet.

Il est aussi à noter qu'après activation thermique, aucun allongement du polymère n'est observé (figure 5). Le pic des monophosphates diminue d'intensité, mais aucun pic n'apparaît dans la région des Q^2 (ce qui serait le cas si on formait des chaînes à 3 phosphates ou davantage).

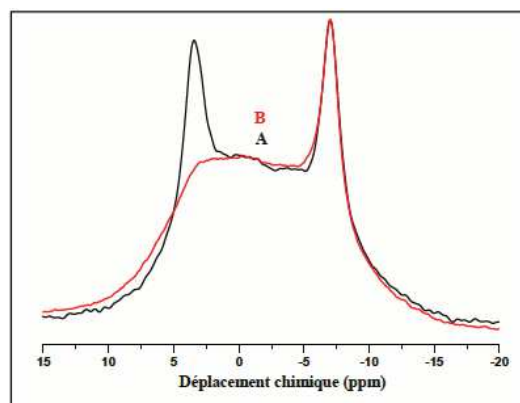


Figure 5 : RMN de ^{31}P , 1 pulse de 10 % Pi / Mt après séchage à 70°C (A) et après activation thermique à $130^\circ\text{C}/3\text{h}$ (B).

Les analyses en RMN 2D $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ ont montré les mêmes résultats que pour la silice, c'est à dire que les phosphates, aussi bien monomériques que dimériques, semblent corrélés avec les protons de l'eau (avant chauffage) et avec des protons de silanols associés (après chauffage). Encore une fois, cette eau n'est vraisemblablement pas rédhibitoire pour la condensation des phosphates.

Le deuxième partenaire dans le cadre de la synthèse de nucléotide est le sucre. On a donc commencé à étudier la réactivité du ribose après adsorption sur la Mt. Après adsorption de 10% R / Mt, la diffraction des rayons X (figure 6) montre que la distance interréticulaire d_{001} augmente de +0,2 nm par rapport à la montmorillonite de départ, où elle valait 1,2 nm (forme à une couche d'eau).

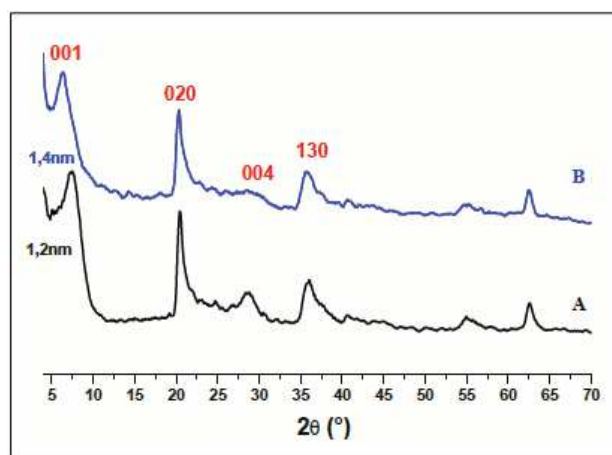


Figure 6 : Diffractogrammes de Mt (A) et 10%R / Mt (B).

Afin de vérifier si cet écartement provient d'une intercalation, on a augmenté progressivement le temps de contact entre la montmorillonite et le ribose. A différentes durées de contact on a observé différents degrés d'écartement des feuillet. La cinétique obtenue est présentée dans la figure 7.

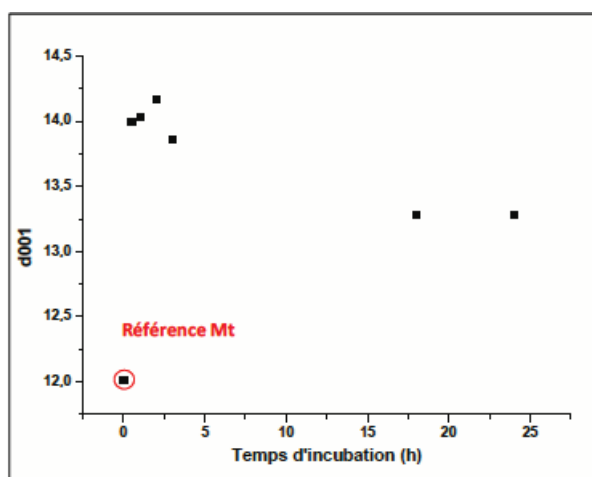


Figure 7 : évaluation par DRX de la distance d_{001} (en Å) de la montmorillonite après mise en contact avec une solution de ribose à différents temps d'incubation.

A temps court d'incubation, l'augmentation de l'espace interfoliaire correspond à la largeur de la molécule de ribose. Ceci indique que la molécule de ribose est intercalée perpendiculairement au feuillet. Cependant, à temps d'adsorption plus long, la molécule semble changer d'orientation pour se retrouver globalement parallèle au feuillet, une configuration qui doit énergétiquement être plus favorable.

En raison de temps, on n'a pas pu continuer l'étude sur la montmorillonite. Il sera certainement intéressant de poursuivre cette étude surtout que la montmorillonite a montré une grande capacité de promotion de la réaction de condensation de phosphates. Je propose donc d'étudier la réactivité thermique du ribose après adsorption sur la Mt puis d'étudier les réactions de phosphorylation et de glycosylation dans différentes conditions de pH, de T_p, sous irradiation UV et présence de sels.

L'ensemble des résultats obtenus est prometteur, il valorise encore une fois notre hypothèse « synthèse prébiotique sur des surfaces minérales ». Ce travail préliminaire montre qu'une exposition du système ribose + Pi (1 :1) /SiO₂ aux rayonnements UV n'empêche pas la formation de PRPP. Par contre, cette exposition accélère la réaction en favorisant l'ouverture du cycle de ribose.

En plus, la capacité de la montmorillonite à promettre la condensation du phosphate inorganique et la capacité de la silice à stabiliser le ribose à haute température indique que chaque système minéral possède un rôle bien défini et particulier sur la Terre primitive. On peut, peut-être, considérer que chaque réactif est délivré par un système minéral particulier. D'où la nécessité d'intégrer nos systèmes séparés dans un scénario prébiotique plausible surtout que sur la Terre primitive on observe l'ensemble de toutes ces conditions.

Un autre problème nécessite aussi d'être résolu, le problème de la co-existence du ribose et de la base azotée. Dans ce contexte, je propose d'étudier la réaction de Formose (formaldéhyde) et la synthèse des bases azotées à partir de formamide séparément puis ensemble sur des surfaces minérales.

Finalement, il faut souligner que la réactivité de ces systèmes ne se comprend bien que si l'on inclut dans la réflexion une approche "science des surfaces". Comme on témoigne la réactivité et le comportement des différents supports, on ne peut pas avancer de scénarios prébiotiques « en phase supportée » sans étudier précisément, au niveau moléculaire, la surface des supports. La collaboration effectuée entre biochimistes et spécialistes des surfaces minérales a largement enrichi ce travail.

Résumé

Dans le contexte prébiotique du « monde ARN », les ribonucléotides sont considérés comme étant les premières espèces à avoir émergé sur Terre. En milieu aqueux, leur formation est défavorable thermodynamiquement. Les voies de synthèse de nucléotides décrites en phase homogène impliquent l'utilisation des molécules activées. En 1951, Bernal a introduit une autre voie de synthèse impliquant des surfaces minérales. Cependant, dans cette voie, les effets thermodynamique et/ou catalytique des surfaces minérales restent inexplorés.

Dans le cadre de l'hypothèse de Bernal, notre travail présente pour la première fois une étude *in-situ* de la réactivité thermique des « briques élémentaires » des nucléotides adsorbés sur des surfaces minérales avec comme objectif de réaliser la synthèse des nucléotides sans activation chimique.

Ce travail a montré dans un premier temps que les surfaces minérales sont capables de déclencher la formation de polyphosphates inorganiques à partir de monophosphates à des températures modérées. D'autre part, l'adsorption du ribose sur la surface de la silice a permis d'améliorer sa stabilisation thermique : alors qu'il est instable dès 90°C en milieux aqueux, il devient stable jusqu'à 200°C après adsorption sur la silice.

Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence la formation de PRPP, un intermédiaire réactionnel très important, par co-adsorption du ribose avec du phosphate inorganique sur la surface de la silice. Enfin, on a pu montrer la glycosylation de l'adénine et la formation après co-adsorption de ses composants sur les deux surfaces minérales utilisées. Une étude préliminaire suggère même la possibilité de dimérisation des nucléotides.

Abstract

In the « RNA world » prebiotic scenario, ribonucleotide polymers are considered as the first biochemical species to have emerged. However, in aqueous media, their formation is thermodynamically forbidden. Several synthesis pathways of nucleotides have been described in aqueous solution; most often, they involve chemically activated molecules. Another pathway to nucleotides implies mineral surfaces, which have been considered in prebiotic processes at least since the work of Bernal in 1951. However, these studies have hardly tried to understand surface-molecule interactions and consequently, thermodynamic and/or catalytic effects of mineral surfaces are not well rationalized.

In the context of Bernal's hypothesis, we present for the first time an *in-situ* study of the thermal reactivity of nucleotides “building blocks” adsorbed on mineral surfaces emphasizing the synthesis of nucleotides without chemical activation.

In our work, we first show that mineral surfaces are able to trigger the formation of inorganic polyphosphates from monophosphates at moderate temperatures. On the other hand, adsorption of ribose on silica surface improves its thermal stabilization. While ribose decomposes at 90°C in aqueous solutions, it is stable up to 200°C on silica.

Secondly, we have demonstrated the formation of PRPP, as important reaction intermediate, by co-adsorption of ribose and KH_2PO_4 on the silica surface. Finally, we showed the glycosylation of adenine to adenosine and the formation of AMP after co-adsorption of their components on both mineral surfaces employed. A preliminary study even suggests that nucleotide dimerisation can occur in the same conditions.