



HAL
open science

**Fabriquer la vie dans un laboratoire de biochimie ?
Expérimentations sur les propriétés évolutives de
réseaux biomoléculaires, enquête ethnographique, et
réflexion épistémologique**

Cyrille Jeancolas

► **To cite this version:**

Cyrille Jeancolas. Fabriquer la vie dans un laboratoire de biochimie? Expérimentations sur les propriétés évolutives de réseaux biomoléculaires, enquête ethnographique, et réflexion épistémologique. Biologie moléculaire. Université Paris-Cité, 2021. Français. NNT : . tel-04520467v1

HAL Id: tel-04520467

<https://theses.hal.science/tel-04520467v1>

Submitted on 20 Oct 2023 (v1), last revised 25 Mar 2024 (v2)

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 de Paris

École doctorale **FIRE 474**

*Laboratoire de Biophysique et Evolution, UMR 8231, ESPCI Paris – PSL, CNRS
Laboratoire d'Anthropologie Sociale, UMR 7130, Collège de France, CNRS, EHESS*

Fabriquer la vie dans un laboratoire de biochimie ?

*Expérimentations sur les propriétés évolutives de
réseaux biomoléculaires, enquête ethnographique, et
réflexion épistémologique*

Par Cyrille Jeancolas

Thèse de doctorat de biologie moléculaire

Dirigée par Philippe Nghe

Et par Perig Pitrou

Présentée et soutenue publiquement le 15/11/2021

Devant un jury composé de :

Purificación López-García, Directrice de Recherche, Université Paris-Saclay, Rapportrice

Sophie Houdart, Directrice de Recherche, CNRS – Université Paris-Nanterre, Rapportrice

Thomas Heams, Maître de Conférences, AgroParisTech, Examineur

Stéphane Douady, Directeur de Recherche, CNRS – Université de Paris, Examineur

Christophe Malaterre, Professeur, UQAM, Membre Invité

Philippe Nghe, Maître de Conférence, ESPCI Paris-PSL, Directeur de Thèse

Perig Pitrou, Directeur de Recherche, CNRS – Collège de France – PSL, Codirecteur de
Thèse

« Il se peut que les chimistes fabriquent quelque jour des substances au sujet desquelles on discutera s'il convient ou non de les appeler vivantes. »

Errera, Léo, 1899, « Essais de philosophie botanique », Revue de l'université de Bruxelles, Tome V, p 545-565

Table of contents

Table of contents	5
Abstract - Résumé	9
Résumé détaillé	13
Remerciements	19
1. Introduction	21

1.1. Préambule	21
1.2. Concevoir l'opposition vivant / non-vivant	22
1.2.1. Saisir l'originalité de la vie : approche historique	22
1.2.2. Zone grise entre l'inerte et le vivant	26
1.3. Chronologie de la quête de l'origine et de la fabrication de la vie	29
1.3.1. La génération spontanée.....	29
1.3.2. Evolution chimique du non-vivant au vivant	31
1.3.3. Une recherche contemporaine interdisciplinaire	35
1.4. L'approche de l'anthropologie des sciences	38
1.4.1. Développement historique de l'approche anthropologique	38
1.4.2. Comprendre la recherche scientifique par l'ethnographie de laboratoire	40
Références	42
2. The Origin of Life: What is the Question?	49
2.1. Introduction	50
2.2. Origins-of-Life Questions and the Constraint of Historical Adequacy	52
2.3. Origins-of-Life Questions and the Constraint of Natural Spontaneity	54
2.4. Origins-of-Life Questions and the Constraint of Life-as-we-know-it	56
2.5. The Dimensions of Origins-of-Life Questions	58
2.6. From Explanation-seeking Questions to Fact-establishing Questions	61
2.7. Epistemic Trajectories and Interdependence of Origins-of-Life Questions	63
2.8. Conclusion	66
References	66
3. Conceptualizing and making life in the laboratory	73
3.1. Water droplets and dark stains: visualizing the making of (proto)life	74
3.1.1. Extending the biological gaze	74
3.1.2. Tracking water droplets on a screen	75
3.1.3. Identifying dark stains on a gel	78
3.1.4. Visualization techniques and the attitudes towards protolives	81
References	84
3.2. Concevoir, fabriquer, interpréter et restituer des protovies	85
3.2.1. Le laboratoire de biochimie de l'ESPCI : berceau de vivants et protovivants	85
3.2.2. Les conceptions de la vie au laboratoire	113
3.2.3. Tour d'horizon des protovies du laboratoire	119

3.2.4. Processus de fabrication et d'interprétation des protovies	127
3.2.5. Finalement, qu'est-ce qu'une protovie ?	137
Références	141
4. The origin of life in microfluidic protocells	149
4.1. Making and interpreting microfluidic protocells	150
4.1.1. Ethnographic extract	150
4.1.2. Context	151
4.1.3. Origins of life and making of artefacts	154
4.1.4. Imitating cells, making protocells	156
4.1.5. Modelling the environment, modelling life	161
4.1.6. Theories and experiences: circular connections.....	166
4.1.7. Discussion	169
References	170
4.2. Emergent fitness and ecological dynamics of compartmentalised autocatalytic chemical reactions	173
4.2.1. Introductory Paragraph	173
4.2.2. Main text	173
4.2.3. Extended Data Figures	185
4.2.4. Extended Data Tables	194
4.2.5. Methods	196
4.2.6. Supplementary Information	202
5. The origins of life in RNA catalytic networks	215
5.1. Strategies to bring about evolution in chemical reactions networks	216
5.1.1. Introduction	216
5.1.2. Evolution via template-based replication	220
5.1.3. Autocatalytic sets, theories and experiments	227
5.1.4. Synthetic RNA evolution using engineered group I introns ribozymes	232
5.1.5. Spontaneous emergence of evolutionary dynamics from complex chemical mixtures	246
5.1.6. Conclusion and discussion	249

References	252
5.2. RNA diversification by a self-reproducing ribozyme revealed by deep sequencing and kinetic modelling	261
5.2.1. Main text	261
5.2.2. Supplementary informations	267
References	291
6. Thresholds in origin of life scenarios	293
6.1. Introduction	294
6.2. The diversity of thresholds in origin of life	295
6.3. The error threshold and the replicase	299
6.4. Refining and revising the replicase scenario	302
6.5. Generalizing the threshold approach	303
6.6. Articulating series of thresholds	306
6.7. Discussion	309
References	311
9. Conclusion	319

Abstract - Résumé

English

Making life from scratch in a biochemical laboratory? Implementation of evolutionary properties in biomolecular networks, ethnographic investigation, and epistemological reflection

Keywords: origin of life, Darwinian evolution, RNA, droplets microfluidics, philosophy of science, anthropology of life, laboratory ethnography

The question of abiogenesis (i.e. the origin of life) is a cross-cutting issue at the intersection of scientific, anthropological and philosophical concerns. This interdisciplinary thesis combines approaches from the natural sciences, the humanities and social sciences to present experimental biochemical results, their context of production and the conceptual landscape in which they are embedded. The field of origin-of-life research encompasses a multiplicity of approaches, including strategies to build evolving physico-chemical systems capable of acquiring new properties, which researchers associate with vital processes, such as metabolism or reproduction. However, since there is no consensus on the definition of life, the meaning of the synthesized artefacts can only be understood by linking their physico-chemical functioning to the epistemic culture of those who produce them. By taking as a case study the biochemistry laboratory of the ESPCI Paris - PSL, we (i) present experimental results of evolutionary processes in biomolecular networks, (ii) highlight the human context of this research on the origin of life, (iii) and propose a conceptual philosophical framework of the transition from the inert to the living. This leads to the elaboration of the concept of "protolives" referring to objects made and interpreted as evolving towards a presumed living state. The study of protolives in the laboratory thus allows us to learn more about abiogenesis, but also about the conceptions of life of the researchers involved. (i) In this thesis, we present the experimental realization of two protolives: a system of microfluidic droplets that grow and divide according to their chemical composition; and a system of catalytic RNAs that reproduce molecularly, generating new RNA species in parallel. The presented results show the possibility of bringing out Darwinian evolutionary properties in non-living synthetic systems, thus allowing the understanding of stages of abiogenesis. (ii) From an anthropological point of view, we present the results of an ethnography (i.e. the description and analysis of a cultural group from the inside) of the production and interpretation of the protolives presented in the biochemical part of the thesis, in relation to the Darwinian conceptions of life of the researchers of the laboratory. Using participant observation and semi-structured interviews, we show how the synthetic systems studied become protolives, as they are experimented with, analysed and discussed. (iii) Finally, using a philosophy of science approach, we refine the different understandings of the very question of the origin of life, according to several axes of constraints linked to: historicity, spontaneity and similarity with life as we know it. This makes explicit the types of questions that protolives allow us to answer. This reflection is accompanied by the establishment of

conceptual tools, in the form of thresholds, to facilitate the conceptualization of origin-of-life scenarios, into which protolives can be situated.

Français

Fabriquer la vie dans un laboratoire de biochimie ? Expérimentations sur les propriétés évolutives de réseaux biomoléculaires, enquête ethnographique, et réflexion épistémologique

Mots clefs : origine de la vie, évolution darwinienne, ARN, microfluidique en gouttelettes, philosophie des sciences, anthropologie de la vie, ethnographie de laboratoire

La question de l'abiogenèse (c'est-à-dire de l'origine de la vie) est une question transversale à l'intersection de préoccupations scientifiques, anthropologiques et philosophiques. Cette thèse interdisciplinaire combine des approches des sciences de la nature, et des sciences humaines et sociales, pour présenter des résultats expérimentaux de biochimie, leur contexte de production et le paysage conceptuel dans lesquels ils s'insèrent. Le champ de la recherche sur l'origine de la vie regroupe une multiplicité d'approches dont l'une consiste à fabriquer des systèmes physico-chimiques évolutifs capables d'acquérir de nouvelles propriétés, que les chercheurs associent à des processus vitaux, comme le métabolisme ou la reproduction. Cependant, comme il n'y a pas de consensus sur la définition de la vie, la signification des artefacts synthétisés ne se comprend qu'en associant leur fonctionnement physico-chimique à la culture épistémique de ceux qui les produisent. En prenant comme cas d'étude le laboratoire de biochimie de l'ESPCI Paris – PSL, (i) nous présentons des résultats expérimentaux de processus évolutifs dans des réseaux biomoléculaires, (ii) nous mettons en lumière le contexte humain de cette recherche sur l'origine de la vie, (iii) et nous proposons un cadre philosophique conceptuel de la transition de l'inerte au vivant. Ceci aboutit à l'élaboration du concept de « protovies » faisant référence aux objets fabriqués et interprétés comme évoluant vers un vivant supposé. L'étude des protovies du laboratoire permet ainsi d'en apprendre plus sur l'abiogenèse, mais aussi sur les conceptions de la vie des chercheurs impliqués. (i) Dans cette thèse, nous présentons les réalisations expérimentales de deux protovies : un système de gouttelettes microfluidiques qui croissent et se divisent en fonction de leur composition chimique ; et un système d'ARN catalytiques qui se reproduisent moléculairement, en générant en parallèle de nouvelles espèces d'ARN. Les résultats présentés montrent la possibilité de faire émerger des propriétés d'évolution darwinienne au sein de systèmes synthétiques non vivants, permettant ainsi d'appréhender des étapes de l'abiogenèse. (ii) D'un point de vue anthropologique, nous exposons les résultats d'une ethnographie (c'est-à-dire la description et l'analyse d'un groupe culturel depuis l'intérieur) de la production et de l'interprétation des protovies présentées dans la partie biochimique de la thèse, au regard des conceptions darwiniennes de la vie des chercheurs du

laboratoire. À l'aide d'une observation participante et d'entretiens semi-directifs, nous montrons comment les systèmes synthétiques étudiés deviennent des protovies, au fur et à mesure des expérimentations, analyses et discussions. (iii) Enfin avec une démarche de philosophie des sciences, nous affinons les différentes compréhensions de la question même de l'origine de la vie, selon plusieurs axes de contraintes liées à : l'historicité, la spontanéité et la similarité avec la vie telle qu'on la connaît. Cela rend explicite les types de questions auxquelles les protovies nous permettent de répondre. Cette réflexion s'accompagne de la mise en place d'outils conceptuels, sous la forme de seuils, pour faciliter la conceptualisation de scénarios d'origine de la vie, dans lesquels peuvent s'insérer les protovies.

Résumé détaillé

Cette thèse questionne la transition de l'inerte au vivant en cherchant à dépasser la division entre les sciences de la nature d'une part et les sciences humaines et sociales d'autre part. À l'aide des outils de la biochimie, de la biologie moléculaire, et de la modélisation mathématique, je présenterai des résultats expérimentaux et des modèles de processus évolutifs dans des réseaux biomoléculaires permettant de comprendre des étapes de l'origine de la vie. Avec une méthode ethnographique, je restituerai la science en train de se faire et je montrerai comment les objets produits sont fabriqués et interprétés comme des objets entre le non-vivant et le vivant. Et enfin, via une réflexion épistémologique, je proposerai un cadre conceptuel pour affiner la

question de l'origine de la vie et établir des scénarios d'origine de la vie. Ces trois axes de réflexions ne sont pas accolés les uns après les autres, de façon pluridisciplinaire, mais s'entrelacent pour former un tout cohérent interdisciplinaire, voire transdisciplinaire.

Dans le chapitre 1, je propose une introduction qui mets en contexte la recherche interdisciplinaire actuelle sur la transition de l'inerte au vivant par l'intermédiaire d'une récapitulation historique succincte. La partie 1.2 montre l'évolution de la conceptualisation de la vie comme un phénomène plus ou moins distinct du reste du monde et comment scientifiques et philosophes conçoivent la zone grise entre non-vivant et vivant. La partie 1.3 présente de façon simplifiée l'évolution historique des recherches sur la possibilité de franchir cette zone grise, de façon analytique et synthétique, en passant de la question de la génération spontanée à celle de l'évolution chimique. Elle se clôt sur une brève présentation de l'état de la recherche interdisciplinaire actuelle sur la transition de l'inerte au vivant. Enfin la partie 1.4 présente sommairement l'évolution de la démarche anthropologique appliquée à l'étude des savoirs et à l'utilisation de l'ethnographie pour expliquer le fonctionnement des laboratoires de science depuis l'intérieur.

Le chapitre 2 « The origin of life: what is the question? » opère une clarification conceptuelle épistémologique pour démêler les différentes interprétations de la question de l'origine de la vie qui a cours dans différentes disciplines de recherche. Il est issu d'un manuscrit que j'ai co-écrit avec C. Malaterre et P. Nghe et qui est destiné à être publié dans une revue de philosophie des sciences ou une revue scientifique interdisciplinaire. Notre analyse de la littérature scientifique nous conduit à identifier trois différents types de contraintes épistémiques qui sont (ou non) appliquées à la question et qui sont liées à : l'adéquation historique, la spontanéité naturelle et la similarité avec la vie telle qu'on la connaît. La combinaison de ces contraintes nous amène à discerner huit types d'interprétations possibles de la question suivant qu'elles soient appliquées ou non. Chaque interprétation permet de reformuler la question et correspond à des investigations différentes en utilisant des méthodes spécifiques relatives par exemple à la chimie prébiotique, à la biologie de synthèse ou à l'exobiologie. La clarification des différentes interprétations de la question montre également un passage des "questions de recherche d'explication" vers des "questions d'établissement de faits" et met en évidence la façon dont les réponses à une certaine interprétation peuvent ou non contribuer à répondre à d'autres interprétations de la même question. Le chapitre suivant montre comment les chercheurs du laboratoire de biochimie sont engagés dans une interprétation spécifique de la question de l'origine de la vie.

Dans le chapitre 3 « Conceptualizing and making life in the laboratory » je restitue une ethnographie des pratiques du laboratoire de biochimie de l'ESPCI en lien avec l'origine de la vie, en m'appuyant sur mon observation participante (de 2018 à 2021), sur la tenue d'entretiens semi-directifs et sur la lecture de projets et d'articles scientifiques issus du laboratoire. Le chapitre est divisé en deux parties. La partie 3.1 est l'adaptation du texte "Water droplets and dark stains. Visualizing the prototyping of life in the laboratory" que j'ai présenté le 31 mai 2021 à la conférence "Visualizing the Origins of Life" organisée par la Fémis et l'Observatoire de Paris. Elle prend les techniques de visualisation comme fil conducteur pour introduire la

façon dont les expérimentateurs du laboratoire fabriquent et interprètent des artefacts engagés dans une évolution supposée de l'inerte au vivant que j'appelle des « protovies ». Je compare les visualisations de deux types de protovies : des gouttelettes microfluidiques qui croissent et se divisent en fonction de leur composition chimique d'une part, et d'autre part, des systèmes d'ARN catalytiques qui se reproduisent moléculairement, en générant en parallèle de nouvelles espèces d'ARN. Les restitutions scientifiques de ces deux projets font respectivement l'objet des chapitres 4.2 et 5.2. Cette ethnographie comparative montre que, malgré les différences d'interaction avec les protovies, les expérimentateurs sont engagés dans un travail commun que j'appelle « extension du regard biologique » et visant à interpréter des phénomènes techniques physico-chimiques comme des réalisations de processus vitaux.

La partie 3.2 est une ethnographie plus complète du fonctionnement du laboratoire axé sur la fabrication, l'interprétation et la restitution des protovies principalement de 2010 à 2020 dans des articles scientifiques. Elle s'ouvre sur une description du fonctionnement du laboratoire de biochimie comme un lieu dans lequel une équipe de scientifiques interagit avec des objets vivants, des assemblages entre fragments d'objets vivants et de matériaux inertes (objets hybrides), et des protovies. Je montre comment certains objets hybrides ont historiquement été amenés à être interprétés comme des protovies en suivant le parcours d'Andrew, le chef de l'équipe (3.2.1). Je fais ensuite ressortir quelles sont les conceptions de la vie soutenues spontanément ou de façon réfléchie par les chercheurs tout en étant attentif à l'influence de la culture épistémique (3.2.2). Je montre que les conceptions darwiniennes de la vie se retrouvent alors dans la diversité des protovies fabriquées au laboratoire dont je propose un tour d'horizon (3.2.3). Par la suite je présente comment les artefacts sont fabriqués, interprétés et restitués en protovies dans des articles par un travail conceptuel d'extension du regard biologique (3.2.4). Enfin, à la lumière des développements précédents et d'exemples dans la littérature scientifique et anthropologique, je discute de la spécificité du concept de protovie permettant une analyse conjointe de l'abiogénèse et des conceptions de la vie des chercheurs impliqués (3.2.5).

Le chapitre 4 « The origin of life in microfluidic protocells » analyse ethnographiquement et scientifiquement un type particulier de protovies sous la forme de systèmes de gouttelettes microfluidiques comportant des réactions autocatalytiques. Pour ce projet, j'ai mené des expériences et analyses pendant 6 mois pour mon stage de fin d'étude, que j'ai progressivement arrêtées pour mon doctorat afin de prendre un statut d'observateur. La partie 4.1 est une adaptation de l'article 'Modéliser la transition de l'inerte au vivant' publié dans le n°73 de la revue d'anthropologie *Techniques & Culture* en 2020. Elle est une restitution ethnographique de la production et de l'interprétation des gouttelettes en protovies. Par ce biais, je montre deux grandes étapes de cette construction caractérisée par une imitation d'êtres vivants (cellules) puis par une modélisation de la vie. Au fur et à mesure des résultats expérimentaux et des discussions, de nouveaux concepts biologiques sont appliqués et les artefacts acquièrent de plus en plus de processus vitaux, les rendant de ce fait de plus en plus vivant dans le langage des chercheurs. Cette ethnographie montre une succession d'élaborations conceptuelles qui disparaissent lors de la restitution scientifique (partie 4.2) où il n'est plus fait mention de gouttes « gagnantes », « perdantes » ou « mortes » par exemple.

La partie 4.2 est une adaptation du manuscrit qui restitue les résultats scientifiques du projet préalablement décrit dans l'ethnographie, et qui est destiné à la publication dans une revue de sciences de la nature. Je l'ai coécrit avec H. Lu, A. Blokhuis, R. Turk-MacLeod, G. Woronoff, A. Abrishamkar, F. Ferrage, P. Pelupessy, L. Jullien, E. Szathmary, P. Nghe and A. D. Griffiths. Le texte de cette partie est donc une production collective du laboratoire de biochimie, et un aboutissement des activités décrites précédemment, à destination des chercheurs en sciences de la nature. Nous y restituons les résultats scientifiques du projet en montrant théoriquement et expérimentalement, qu'une chimie autocatalytique de glucides peut être couplée à la croissance et à la division de compartiments, conduisant à des dynamiques écologiques émergentes. Notre approche combine des techniques de microfluidique en gouttelettes, de chimie analytique, de microscopie optique à fluorescence et de modélisation mathématique. Lorsque la réaction de formose autocatalytique est compartimentée dans des gouttelettes microfluidiques, les gouttelettes contenant des réactions autocatalytiques efficaces doublent de volume au détriment des gouttelettes contenant des réactions autocatalytiques moins efficaces, qui diminuent de volume, par osmose et diffusion sous l'effet de la compétition pour un réactif commun (le formaldéhyde). Un cisaillement hydrodynamique entraîne par la suite une division sélective des plus grosses gouttelettes uniquement, convertissant ainsi les différences de croissance en différences de tailles de populations. En outre, la compétition pour un composé chimique commun entraîne une dynamique « écologique » : les taux de croissance des gouttelettes varient en fonction de la composition des gouttelettes environnantes. Le système présente également une forme rudimentaire d'héritabilité non génétique : les taux de croissance des gouttelettes après division sont en corrélation avec les disparités de taux de croissance induites par différentes combinaisons de gouttelettes voisines avant division. Ce système présente un certain nombre de caractéristiques des systèmes vivants préalables à une évolution par sélection naturelle, et représente une étape importante vers la compréhension de l'émergence des premiers systèmes darwiniens et la conception de systèmes chimiques synthétiques évolutifs.

Le chapitre 5 « The origin of life in RNA catalytic networks » montre comment faire émerger des propriétés d'évolution darwinienne dans des réseaux de réactions chimiques en développant le cas particulier des réseaux d'ARN catalytiques. La partie 5.1 est la fusion et l'adaptation de deux manuscrits à l'attention de chercheurs en biochimie dont l'un est destiné à être publié en tant que chapitre de l'ouvrage *Prebiotic Chemistry and Life's Origin* à venir (édité par M. Fiore aux éditions The Royal Society of Chemistry Press) et l'autre destiné à être publié dans une revue de biochimie. J'ai co-écrit ces deux manuscrits avec S. Ameta, A. Blokhuis et P. Nghe pour le premier, et C. Lambert, M. Vyborniy, S. Ameta et P. Nghe pour le second. La partie qui en résulte est un état de l'art non exhaustif sur les principales stratégies qui ont été adoptées pour la théorisation et la construction de réseaux de réactions entre biomolécules capables de propriétés évolutives. Nous présentons comment il est possible d'implémenter des propriétés comme la reproduction avec hérédité dans de tels réseaux suivant plusieurs stratégies. Par exemple, les systèmes chimiques de ligature sur modèle (*templatebased ligation*) contiennent des polymères « modèles » (ADN, ARN ou protéine) sur lesquels peuvent se fixer deux morceaux de polymères complémentaires aux modèles. La ligature entre ces deux morceaux

aboutit à un polymère complémentaire au polymère modèle, qui peut à son tour fixer deux morceaux du polymère modèle et les joindre entre eux pour fournir un nouvel exemplaire de polymère modèle, ce qui constitue une réplication. Une autre stratégie consiste à mettre au point des systèmes de biomolécules capables de synthétiser, monomère par monomère, un polymère modèle pour aboutir à une réplication par polymérisation. Enfin une troisième stratégie concerne les ensembles autocatalytiques qui regroupent des molécules dont l'ensemble des activités catalytiques permettent leur propre production de façon cyclique. Nous montrons ensuite comment un certain type de molécules d'ARN, les « group I introns », sont utilisés pour mettre en œuvre les trois stratégies d'évolution évoquées. Les ARN sont particulièrement intéressants pour la construction de systèmes chimiques darwiniens car ils sont aptes à stocker de l'information génétique et à catalyser des réactions chimiques (on parle alors de ribozymes pour désigner les ARN capables de catalyser). La partie se clôt en discutant une nouvelle manière de faire émerger des dynamiques d'évolution au sein de mélanges chimiques complexes et en l'absence d'une connaissance réductionniste du système.

La partie 5.2 est l'adaptation d'un article éponyme de biochimie expérimentale publié en 2021 dans le volume 57 de *Chemical Communications* (pp 7517-7520). J'ai été le chef de projet de cet article dans son ensemble (expériences, analyse, écriture) en collaboration avec Y. J. Matsubara, M. Vybornyi, C. N. Lambert, A. Blokhuis, T. Alline, A. D. Griffiths, S. Ameta, S. Krishna et P. Nghe. Les résultats scientifiques restitués sont l'aboutissement de plusieurs pratiques décrites de façon ethnographique dans la partie 3.2. Dans ce manuscrit, formaté à l'attention de chercheurs en biochimie, nous montrons la réalisation d'un système expérimental, fondé sur les propriétés d'un ARN de la famille des ribozymes group I intron surnommé *Azoarcus*, et présentant simultanément des processus de réplication et de diversification. Notre approche combine plusieurs techniques : biologie moléculaire, analyse qualitative et quantitative de gels d'électrophorèse, séquençage de nouvelle génération (NGS) et modélisation mathématique. Nous montrons que dans un seul et même système chimique contenant trois espèces de fragments d'ARN : deux fragments s'auto-assemblent puis forment des ribozymes par ligature. Une fois formés, ces ribozymes catalysent la ligature des deux fragments, ce qui correspond à de l'autoreproduction. En parallèle, les ribozymes font subir une série de réactions de recombinaison entre les fragments de la troisième espèce d'ARN faisant émerger des ARN nouveaux jusqu'à 5 fois plus longs, mais aussi des ARN circulaires et une population variée d'ARN de différentes séquences et repliements. Par ailleurs, l'ensemble des réactions se fait sans aucun apport d'énergie extérieur. Les fréquences des principales séquences d'ARN ainsi formées sont efficacement prédites par un modèle mathématique cinétique simple. L'intégration rationnelle de l'autoreproduction, de la diversification et du stockage d'informations dans des réseaux de réactions neutres sur le plan énergétique constitue une étape importante vers la construction de systèmes d'ARN capables d'évoluer de manière darwinienne.

Enfin, le chapitre 6 « Thresholds in origin of life scenarios »¹ est l'adaptation d'un article éponyme de perspective publié en 2020 dans le volume 23 de la revue *iScience* et coécrit avec

¹ Pour un article vulgarisé présentant cette recherche, voir : <https://theconversation.com/auxseuils-de-lorigine-de-la-vie-157371>

C. Malaterre et P. Nghe à destination d'un public interdisciplinaire de scientifiques et de philosophes des sciences. À partir d'une étude de la littérature scientifique et d'une réflexion épistémologique sur la façon dont la recherche sur l'origine de la vie est actuellement menée, nous présentons un cadre conceptuel heuristique pour faciliter l'établissement de scénarios d'origine de la vie. Nous proposons les seuils comme une notion opérationnelle pour décomposer les scénarios, articuler la théorie et l'expérience, et évaluer la plausibilité des scénarios en coordonnant les efforts interdisciplinaires. Un seuil peut être défini comme un changement qualitatif majeur subi par un système physico-chimique lors de changements relativement mineurs dans les valeurs des paramètres de contrôle systémiques ou environnementaux. De nombreuses transitions prébiotiques invoquent des seuils de manière explicite ou implicite, comme l'apparition de l'homochiralité, la réplication, la compartimentation et même l'évolution darwinienne. Nous prenons comme cas d'étude le « seuil d'erreur » (*error threshold*) d'Eigen qui est l'un des seuils les plus étudiés dans les études sur l'origine de la vie. L'apparition et le maintien d'un régime de réplication de molécules sont limités par ce seuil d'erreur, qui impose une borne au taux d'erreur de la réplication. L'accumulation de modèles et d'expériences a permis de raffiner l'équation du seuil d'erreur et a conduit à abaisser ou à augmenter le seuil, réduisant ou augmentant de ce fait la plausibilité de l'apparition et du maintien d'un régime de réplication spécifique. Il est possible de généraliser les différentes transitions de seuil dans un cadre unificateur selon la nature du paramètre dont les valeurs varient, sous la forme d'un diagramme de phase. Une analyse approfondie des seuils favorise la mise en évidence d'une multitude de paramètres physiques, chimiques et géologiques, jouant sur la plausibilité des transitions. Le concept de seuil s'avère être un outil interdisciplinaire privilégié pour rapprocher les propositions théoriques sur l'origine de la vie et leurs réalisations pratiques. De plus, l'articulation des seuils les uns par rapport aux autres permet aussi d'aller plus loin en révélant des scénarios possibles d'origine de la vie ou des voies de fabrication d'êtres vivants synthétiques. De telles articulations sont particulièrement utiles notamment pour tracer des chemins évolutifs complexes car l'intégration de la plausibilité de chacune des transitions considérées facilite l'estimation de la plausibilité de scénarios entiers, et donc la comparaison entre eux. Enfin, la transition de seuil, aussi petite soit-elle, peut être un moyen de conceptualiser l'augmentation progressive du "degré de vie" d'un système physicochimique. La quantification du degré de vie de tout système situé quelque part entre le nonvivant et le vivant pourrait être évaluée comme le rapport entre le nombre de seuils franchis et le nombre de seuils envisagés dans un scénario donné d'origine de la vie.

Remerciements

Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans le soutien sans faille que j'ai reçu de la part de Philippe Nghe, Perig Pitrou et Christophe Malaterre que je remercie tous sincèrement. Leurs expertises ont été d'une aide indispensable dans les déploiements des dimensions biochimiques, anthropologiques et philosophiques. Leur engagement total dans la collaboration interdisciplinaire a constitué un moteur essentiel à la réalisation de l'ensemble des projets. Philippe, tu m'as accordé une confiance totale pour la réalisation et l'analyse d'expériences biochimiques ardues et tu as fait preuve de soutien et de patience admirables dans les moments de difficultés. Tu as accepté d'être à la fois un mentor scientifique et un sujet d'étude anthropologique en faisant preuve de la plus grande transparence sur l'ensemble des processus constitutifs des recherches menées au laboratoire.

Perig, tu m'as ouvert les portes de ton équipe, du monde de l'anthropologie et tu m'as fait bénéficier d'une formation accélérée à l'anthropologie de la vie et à l'ethnographie de laboratoire. Tu m'as confié les clefs pour mener à bien un questionnement réflexif sur mes

propres recherches et celles de mes collègues. Grâce à toi, j'ai réussi à effectuer le mouvement inverse de nombreux anthropologues en initiation : étant d'abord indigène, tu m'as donné les outils pour réfléchir au mieux comme un anthropologue.

Christophe, je me souviens de notre rencontre en 2016 à Montréal où je te faisais déjà part de mon envie d'entreprendre une recherche interdisciplinaire en sciences de la nature et sciences humaines et sociale sur l'origine de la vie. Tes conseils depuis lors, et ton implication dans plusieurs projets de cette thèse ont nourri une réflexion globale qui n'est pas près de s'arrêter.

Je tiens à remercier sincèrement Ludovic Jullien et François Guyot qui ont non seulement accepté de suivre les avancées de cette thèse du début à la fin, en apportant des conseils précieux, mais qui m'ont aussi ouvert à la recherche sur l'origine de la vie dès 2015. Je vous suis grandement redevable de m'avoir tendu la main aussi tôt et d'avoir continué à me soutenir.

Je remercie profondément Andrew Griffiths d'avoir ouvert les portes de son laboratoire à une enquête ethnographique, d'avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions et d'avoir été force de proposition pour de nombreux projets.

Je tiens aussi à remercier l'Université de Paris et plus spécifiquement le Centre de Recherche Interdisciplinaire et l'école doctorale 474 pour m'avoir fait confiance en finançant cette recherche.

Je remercie Sophie Houdart et Purificación López-García d'avoir accepté la responsabilité d'être rapportrices d'une thèse aussi interdisciplinaire, ainsi que Thomas Heams et Stéphane Douady d'avoir accepté de participer au jury en tant qu'examineur.

Merci à Heng et Sandeep A. de m'avoir formé avec patience respectivement à la microfluidique et à la biochimie de l'ARN et d'avoir accepté de se livrer lors d'entretiens.

Je tiens particulièrement à remercier Misha et Camille L. pour leur collaboration étroite pour les expériences et l'analyse des systèmes d'ARN et pour avoir dépassé ensemble les difficultés techniques avec détermination. Misha tu m'as appris l'abnégation et la détermination face aux expériences, et Camille L. ton travail sur l'analyse des séquençages a été décisif.

Je remercie sincèrement Sanjay et Sandeep K. pour nous avoir accueilli en Inde dans leurs laboratoires et avoir organisé des discussions aussi passionnantes que fructueuses pour nos travaux communs. Je suis infiniment redevable d'Angad de nous avoir fait découvrir ce merveilleux pays sur notre temps libre en compagnie de Philippe, Camille et Yoshiya. Tu trouveras en moi un guide personnel quand tu viendras à Paris.

Yoshiya, je te remercie de ta collaboration indispensable pour la modélisation et de la patience dont tu as fait preuve.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du LBC, particulièrement Alex pour nos discussions passionnantes sur des considérations essentielles sur l'origine de la vie, Pablo, Sophie, Gaël, Robin, Adeline et Andrea pour avoir répondu à mes sollicitations régulières et d'avoir partagé des moments inoubliables, et Hélène et Isa pour leur soutien administratif sans faille et leur bonne humeur à toute épreuve.

Je remercie aussi les membres passés et présents de la nouvelle équipe du LBE, particulièrement Alexandra et Camille E. d'avoir égayé la fin de ma thèse.

Je tiens à remercier Lauren, Fabien et Elie pour les discussions captivantes que nous avons eues à propos de l'anthropologie. Lauren, je te suis particulièrement redevable pour m'avoir intelligemment conseillé dans l'écriture de mon premier article.

Les discussions et les activités auxquelles j'ai pris part dans le cadre du collectif « La vie à l'œuvre » m'ont permis de repousser encore plus loin les frontières de l'interdisciplinarité et je remercie sincèrement l'ensemble de ses membres qui m'ont inspiré chacun à leur manière. Je ne peux terminer sans remercier mes parents, ma famille et mes amis pour le soutien et le bonheur qu'ils m'apportent au quotidien. Je te remercie particulièrement Alex pour les discussions inspirantes que nous avons depuis celle de l'Arc de Triomphe, et je vous remercie Pierre et Henry pour toutes ces pauses salvatrices que j'ai pu partager avec vous dans vos locaux ou ailleurs (longue vie à Logora !).

Enfin, je te remercie infiniment Gaby pour la relecture assidue de ma thèse et surtout pour ton aide précieuse sur tous les aspects de ma vie.

1. Introduction

1.1. Préambule

La quête des origines de la vie rejoint celle de la compréhension du fonctionnement de la vie dans son unité et sa diversité, abordée par une double approche d'observation et d'expérimentation. Dans ce cadre, une approche consiste plus particulièrement à reconstruire pour comprendre, c'est-à-dire synthétiser la matière vivante en laboratoire. La transition de l'inerte au vivant peut en effet se concevoir selon deux grandes modalités naturelles et techniques. D'une part la vie a historiquement émergé sur Terre et elle pourrait avoir apparu ailleurs dans l'univers. D'autre part l'humain est engagé dans une production de systèmes artéfactuels qui se rapprochent de systèmes vivants. Ces deux grands aspects se déclinent en

plusieurs interrogations qui sollicitent une multitude de méthodes propres à la plupart des disciplines des sciences de la nature, de tendance analytiques ou synthétiques.

Dans le cadre de la recherche sur l'origine historique de la vie sur Terre, les micropaléontologues recherchent les plus anciennes traces de vie microbienne par détection de fractionnements isotopiques, et les chimistes prébiotiques reproduisent des réactions chimiques à l'origine des biomolécules, dans les conditions de la Terre primitive. Par ailleurs, la recherche de la vie dans l'espace (l'exobiologie) embarque des spectromètres de masse dans des modules spatiaux pour analyser les compositions chimiques à la surface de planètes ou de comètes.

D'un autre côté, la volonté de produire des systèmes vivants nouveaux en laboratoire, par une logique ascendante (*bottom-up*) ou descendante (*top-down*), fait appel à d'autres champs disciplinaires qui se démarquent par leurs méthodes. Par exemple, la production de « cellules artificielles » sollicite des outils de synthèses chimiques et biochimiques aboutissant à des dynamiques de biomolécules compartimentées. D'autre part, la recherche de « cellules minimales » sollicite les instruments de la génomique et de la biologie de synthèse pour modifier et retirer des parties entières de génomes de bactéries.

Ces constats montrent la nécessité d'une démarche collaborative entre diverses disciplines des sciences de la nature pour espérer comprendre la transition de l'inerte au vivant autant dans sa dimension analytique que synthétique. Mais cette exploration interdisciplinaire ne se cantonne pas pour autant seulement à la vie telle qu'on la connaît. Ainsi la vie telle qu'elle pourrait être ailleurs dans l'univers et des formes de vies qu'il serait possible de fabriquer en laboratoire occupent les esprits des chercheurs. Leur aptitude à imaginer des êtres vivants éloignés de ce que nous connaissons culmine dans la recherche sur la « vie artificielle » qui entend coder des logiciels « vivants » à proprement parler. Ces diverses entreprises d'imagination et de fabrication de formes de vie nouvelles exigent un niveau supérieur d'interdisciplinarité mobilisant les approches anthropologiques et épistémologiques qui visent à étudier les ambitions et les moyens que les scientifiques se donnent pour fabriquer la vie en laboratoire. Ces opérations font échos à l'incessante volonté que l'humain a de maîtriser, de modifier et d'imiter le vivant depuis l'agriculture, l'élevage et la sélection artificielle jusqu'à la création d'écosystèmes clos comme le projet Biosphère II, la fabrication de robots humanoïdes donnant l'illusion de vie, la production d'organismes génétiquement modifiés et la construction d'organoïdes.

Aujourd'hui la recherche scientifique dispose désormais d'un arsenal technologique pour aborder les questions existentielles les plus anciennes comme celle de l'origine de la vie. Dans ce cadre, le laboratoire de biochimie de l'ESPCI est le théâtre d'approches synthétiques mises au point pour comprendre la transition de l'inerte au vivant, et qui appelle un questionnement sur les moyens technoscientifiques permettant la reproduction artificielle de processus vitaux.¹

¹ Au moment de la restitution de cette thèse, je ne suis plus affilié au laboratoire de biochimie mais au laboratoire de biophysique et évolution issu de la restructuration de ce dernier.

Il s'agit d'un lieu d'expérimentation et de conceptualisation interdisciplinaire dont la spécialité est l'étude, l'utilisation et la mise au point de systèmes biomoléculaires et de systèmes vivants capables d'évolution darwinienne. Étant biochimiste de formation et m'ouvrant à une démarche réflexive anthropologique, ma présence dans ce laboratoire est l'occasion d'une double observation : celle portée sur des processus physicochimiques et biomoléculaires propres au vivant, et celle attentive aux techniques mises en place par les chercheurs pour les mettre en œuvre. À cela s'ajoute la question de la signification, à savoir la sélection des critères qui justifient l'interprétation d'un artefact technique comme un véritable prototype d'être vivant. Ces considérations m'ont amené à m'impliquer dans trois types d'investigations complémentaires : deux études expérimentales sur les propriétés évolutives de réseaux biomoléculaires, une ethnographie anthropologique des pratiques de recherche du laboratoire et une réflexion épistémologique sur la question même de l'origine de la vie et une sur l'établissement de scénarios de l'inerte au vivant.

1.2. Concevoir l'opposition vivant / non-vivant

1.2.1. Saisir l'originalité de la vie : approche historique

La distinction théorique entre le vivant et le reste du monde peut être datée au moins des recherches d'Aristote. Il distingue les êtres vivants des objets inanimés par leur capacité à se nourrir, se reproduire, percevoir, se mouvoir et penser.¹ Plus particulièrement, il considère la nutrition et la reproduction comme les propriétés les plus fondamentales des êtres vivants, en étendant le concept de nutrition à la capacité de s'auto-entretenir (ces deux facettes attribuées au vivant cristallisent d'ailleurs les débats actuels sur la nature de la vie).² Le préfixe « auto- » est ici crucial car le philosophe considère que les processus vitaux sont causés par les organismes eux-mêmes grâce à la présence d'une « âme ».¹

Au gré de périodes d'oubli et de redécouvertes, les idées d'Aristote demeurent très influentes dans les entreprises de théorisation de la vie, jusqu'aux écrits de Descartes.³ Influencé par la vision mécaniste de la nature qui s'impose peu à peu à la suite des travaux de Newton, le philosophe français interprète les êtres vivants comme des automates complexes de la même nature que la plupart des machines et dispositifs techniques de son époque. S'il se garde toutefois d'assimiler l'homme à une machine de par son âme, Jean Offray de la Mettrie franchit le pas dans « L'Homme Machine »⁴ en associant l'ensemble des êtres vivants, humain compris, à des machines fonctionnant sous la contrainte des mêmes lois physiques que les objets inertes.

¹ Le terme original est *psuchê* en grec ancien, qui diffère de l'acceptation moderne de l'âme par la restriction à un principe substantiel qui confère la vie, sans dimension religieuse associée à une vie après la mort.¹¹³

Cependant, l'évolution des connaissances au XIX^{ème} siècle sur les plantes et les animaux tendent à montrer que les lois mécaniques ne suffisent pas à expliquer leur comportement. Ce constat est à l'origine du mouvement vitaliste qui postule une force spéciale propre aux êtres vivants et à la source de l'ensemble des processus vitaux.⁵ En réaction à cette école de pensée, des philosophes et des scientifiques proposent une alternative connue sous le nom d'émergentisme^{6,7} pour rendre compte des processus vitaux, sans faire appel à une force ou une substance proprement vitale. De ce fait, les phénomènes de la vie sont interprétés comme des propriétés spécifiques émergentes qui ne peuvent être comprises par les seules lois fondamentales de la physique. Les êtres vivants sont alors composés des mêmes particules élémentaires que les objets inanimés, mais présentent une complexité d'organisation telle que les processus générés ne se réduisent pas aux lois qui régissent leurs particules physiques.

La publication de « l'Origine des Espèces » de Darwin en 1859 amorce une révolution conceptuelle dans la manière d'envisager le vivant dans son unité et sa diversité.⁸ La sélection naturelle, c'est-à-dire la survie et la reproduction différentielle des êtres vivants sur la base de variations physiques hérissables, offre la possibilité de relier les comportements des particules les plus élémentaires aux processus biologiques à l'échelle des organismes et des écosystèmes. Ce lien est définitivement assuré par la découverte de la structure de l'ADN un siècle plus tard⁹ et par le développement spectaculaire de la biologie moléculaire qui promet une compréhension totale des processus vitaux. Francis Crick affirme ainsi que nous avons « percé le secret de la vie », découvert le « dogme centrale de la biologie moléculaire » et Jacques Monod assure que l'ensemble des découvertes sur les mécanismes de la bactérie *Escherichia Coli* sont aussi valables pour l'éléphant. Avec le développement contemporain de la cybernétique, puis de l'informatique, la notion de programme génétique émerge en filant la métaphore de l'ordinateur.¹⁰ Non seulement le vivant est ordonné et compréhensible mais cet ordre est inscrit, peut se lire et être exécuté finement.

Malgré les remarquables avancées de la biologie moléculaire, aucune proposition de définition de la vie n'apparaît comme consensuelle. Pour tenter de saisir l'essence du vivant, autrement que par des définitions, des scientifiques élaborent des modèles théoriques supposés décrire leur fonctionnement substantiel. Parmi eux, figurent le système (M,R) de Robert Rosen^{11,12} et le Chemoton de Tibor Gánti¹³ respectivement élaborés à partir de 1958 et 1971.

Robert Rosen considère qu'un « système matériel est un organisme si et seulement s'il est clos sur la « cause efficiente ». La notion de cause efficiente fait référence à l'un des quatre types de causes supposés par Aristote qui comprend aussi la « cause matérielle ». Dans la terminologie de Rosen, la cause matérielle est associée à une transformation de matière par réactions chimiques alors que la cause efficiente correspond à la catalyse. À l'aide d'un formalisme abstrait, il situe les processus de « métabolisme » et de « réparation » (d'où le nom (M,R)), dans un cycle clôt qui traduit l'auto-entretien des organismes (figure 1) et par là leur essence.

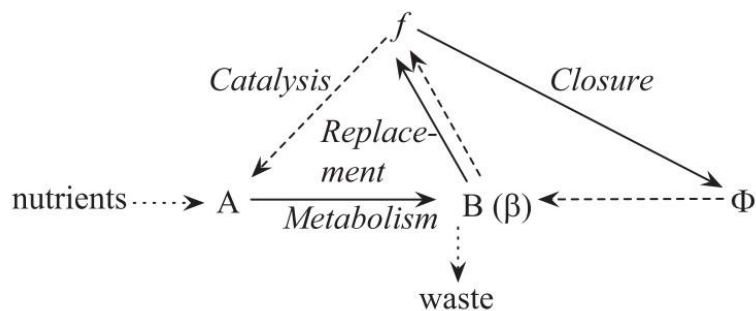


Figure 1. Représentation topologique du système (M,R). Les flèches continues représentent une transformation chimique d'un élément en un autre tandis que les flèches en pointillées représentent le pouvoir catalytique d'un élément pour en synthétiser un autre. **A** représente un ensemble de molécules converties par un processus de « métabolisme » en un second ensemble **B**, et catalysées par des molécules de l'ensemble **f**. Les molécules de **B** subissent une transformation catalysée par un ensemble d'enzymes ϕ , pour devenir des molécules de l'ensemble **f** (c'est le processus de « réparation », ou de remplacement, dans la terminologie de Rosen). Les enzymes ϕ sont aussi des produits du métabolisme ce qui permet la clôture du système (β représente la propriété de répliation des éléments de **B**). Cette représentation illustre l'essence d'auto-entretien, plus particulièrement la clôture sur la cause efficiente, spécifique aux êtres vivants selon Robert Rosen. Illustration reprise de ¹⁴.

Le modèle du Chemoton de Gánti, ingénieur biochimiste de formation, est plus proche des connaissances contemporaines sur le fonctionnement moléculaire des êtres vivants. Le Chemoton désigne une unité fondamentale de vie qui composerait les êtres vivants et peut être assimilée à une cellule. Gánti considère cette unité de base comme un « automate fluide » qu'il est possible de concevoir comme un ingénieur concevrait une radio ou un ordinateur.¹³ Cette « machine chimique » à la base de « l'état vivant » doit satisfaire une série de critères essentiels : unité inhérente, métabolisme, stabilité inhérente, sous-système porteur d'information et contrôle d'un programme. À ces critères essentiels s'ajoutent des critères potentiels non nécessaires à l'état vivant, mais dont l'ajout permet la vie comme phénomène globale : croissance et reproduction, capacité de changement héréditaire et mortalité. Gánti fait donc une distinction précise entre les concepts de vivant et de vie qui sont régulièrement confondues ailleurs de façon intentionnelle ou non. Le modèle de l'automate fluide a subi plusieurs réajustements, dont l'ajout de la compartimentation comme propriété essentielle, et peut se représenter sous le modèle reproduit en figure 2 en prenant en compte trois grands cycles de réactions : à la base du métabolisme, du programme génétique et du compartiment.

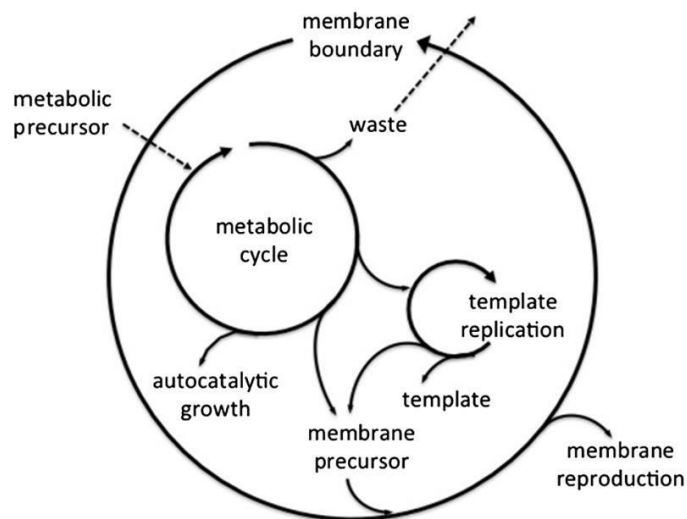


Figure 2. Représentation topologique du modèle du Chemoton. Le Chemoton, qui représente l'unité élémentaire des êtres vivants selon Gánti, est constitué de 3 cycles imbriqués à la base d'une compartimentation membranaire, d'un métabolisme et d'un programme génétique. Le cycle métabolique est alimenté par des précurseurs (nutriments) et génère à son tour les précurseurs nécessaires au cycle de réplique du support génétique et de production de la membrane enveloppante. Illustration reprise de ¹⁵.

Cependant, même pour les défenseurs actuels du Chemoton, ce modèle est à interpréter comme une heuristique à la poursuite d'une biologie théorique la plus cohérente possible plutôt que comme une définition ferme de la vie. Ainsi, une entité matérielle fondée sur l'organisation du Chemoton ne pourrait être vivante car manquant des propriétés clés de la vie non comprise dans le modèle, comme la semi-perméabilité de la compartimentation.¹⁶ Le Chemoton n'est pas un cas isolé car malgré l'accumulation des connaissances sur le fonctionnement de la vie, aucune théorie, modèles ou définition ne parvient à faire consensus dans la communauté scientifique.²

Plus de 120 définitions scientifiques de la vie ont été publiées,¹⁷ faisant référence à des thèmes récurrents¹⁸ qu'il est possible de regrouper autour de trois grands pôles : thermodynamique, métabolique et évolutionnaire.² Un être vivant peut se concevoir alors comme un « système dissipatif loin de l'équilibre »,¹⁹ comme un « système capable de s'autoentretenir grâce à un réseau interne de réactions qui régénèrent tous les composants du système »²⁰ ou tout simplement comme « tout ce qui se réplique et évolue ». ²¹ La définition la plus connue est très certainement celle retenue officiellement par NASA qui considère qu'un système est vivant s'il est « un système chimique auto-entretenu capable d'évolution darwinienne ». ²² Cette définition combine des propriétés métaboliques et évolutives tout en précisant le caractère chimique du système, ce qui exclue les conceptions de logiciels informatiques vivants soutenues dans la discipline de la vie artificielle.²³ Cependant cette définition est considérée par la majorité des scientifiques qui l'utilisent comme une « définition de travail » pour faciliter la recherche malgré plusieurs imperfections²⁴ plutôt qu'une véritable saisie de l'essence de la vie. La quête d'une définition exacte de la vie, qui regrouperait un ensemble de conditions suffisantes et

nécessaires, reçoit d'ailleurs des critiques autant de par son inutilité²⁵ que son impossibilité,²⁶ et les scientifiques affirmant en détenir une sont très minoritaires.

En l'absence d'une définition de la vie qui fasse autorité, des entités en marge comme les virus font l'objet de discussions, voire de controverses, sur leur caractère vivant ou non. Les virus, qui sont composés de petits compartiments protéiques (capsides) remplis de matériel génétique sont incapables ni de métaboliser ni de se reproduire. Ils détournent le métabolisme des cellules qu'ils infectent pour se reproduire. Le biologiste Patrick Forterre propose de changer de point de vue en ne considérant plus les virus seulement comme des capsides remplies de matériel génétique, c'est-à-dire des virions, mais comme étant réellement les cellules infectées, c'est-à-dire les virocelles.²⁷ De ce fait les virocelles seraient une forme des virus et des êtres pleinement vivants qui se reproduisent par virions interposés. D'un autre côté, la biologiste Purificación López-García s'oppose à cette interprétation en avançant pas moins de 10 raisons pour objecter ce qui est considéré comme une élaboration rhétorique sans solide fondement.²⁸

1.2.2. Zone grise entre l'inerte et le vivant

Le cas limite du virus cristallise des débats mais pointe aussi du doigt un consensus qui s'impose dans les disciplines scientifiques concernés par le vivant : l'absence de frontière nette entre l'inerte et le vivant. Le biologiste Thomas Heams fait un état des lieux de la question dans son livre « Infravie – Le vivant sans frontière »²⁹ en examinant une série d'entités situées entre l'inerte et le vivant comme la bactérie *Carsonella C. Rudii* en voie de se déposséder de ses processus vitaux pour s'intégrer dans des cellules d'insectes, comme l'auraient fait il y a quelques deux milliards d'années les ancêtres des mitochondries que l'on trouve dans les cellules eucaryotes. Heams examine aussi la recherche sur l'origine de la vie en montrant que l'absence de frontière nette entre vivant et non-vivant est un prérequis absolu pour penser une émergence graduelle de formes de vie dans un passé lointain, ou pour tenter d'en fabriquer aujourd'hui à la paillasse. Plusieurs expressions existent pour désigner cet espace entre non-vivant et vivant, on parle ainsi de « grayness »,³⁰ de « degree of liveness »,³¹ de « degree of aliveness »,³² ou encore de « scale of livingness ». ³³ Aucun chercheur du domaine ne s'oppose à la théorisation d'un tel espace qualitatif de degrés de vie, mais la quantification de ces degrés de vie se révèle beaucoup plus complexe.

Plusieurs options ont été proposées. Bruylants *et al.* proposent un « indice de vie » (*life index*) s'échelonnant de 0 à 1. La borne supérieure 1 est calibrée par les systèmes vivants les plus simples, à savoir les procaryotes, et la borne inférieure 0 correspond à n'importe quel objet qu'on ne retrouve pas dans des procaryotes ou dont une synthèse abiotique est connue. De ce fait, l'eau a un indice de vie de 0 et l'alanine aussi (car produite abiotiquement dans des météorites par exemple). De leur côté, les nucléotides, l'ARN (polymère de nucléotides) et les ribozymes (ARN catalytiques) ont par exemple des indices de vie croissants. Mais cet indice est dépendant de l'évolution des connaissances scientifiques et ne propose que de trier qualitativement des objets selon un seul axe. Une autre proposition, du philosophe Christophe

Malaterre, suggère d'associer cinq axes pour trier divers objets du non vivant au vivant,³¹ mais sans suggestions précises de quantifications (voir figure 3).

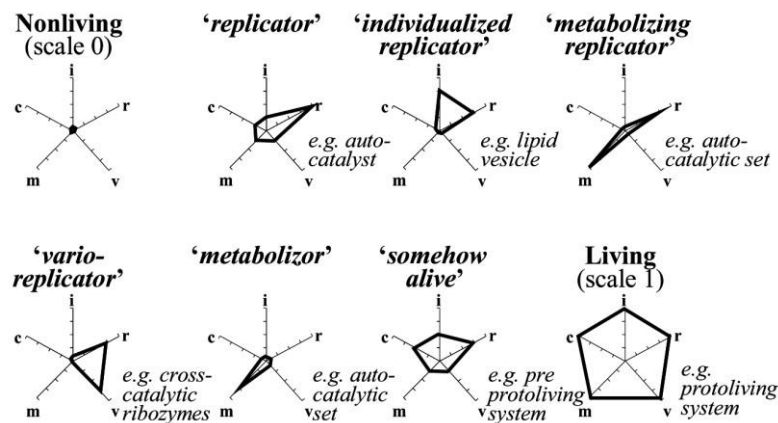


Figure 3. Répartitions de systèmes entre l'inerte et le vivant suivant 5 axes. 'i' représente l'individuation, 'r' la réplication, 'v' la variation, 'm' le métabolisme et 'c' le couplage entre les phénomènes précédents. Figure reprise de ³¹.

Le philosophe Mark Bedau propose quant à lui une quantification d'un tel espace en assimilant les êtres vivants à des systèmes composés de trois sous-systèmes relatifs à un compartiment (C), à un métabolisme (M) et à un programme (P).³⁴ Pour qu'un système soit vivant il faut que les trois sous-systèmes s'auto-entretiennent mais aussi que chaque sous-système participe fonctionnellement à la perpétuation de l'autre, ce qui aboutit à 9 types d'interaction nécessaires. Ce modèle CMP débouche sur une série de systèmes chimiques possédant entre 0 et 9 relations fonctionnelles pouvant ainsi graduer l'espace de degré de vie comme représenté sur la figure 4. Contrairement à l'indice de vie présenté précédemment, les objets se répartissent sur un axe en ne prenant en compte que des relations fonctionnelles et non des considérations sur la nature des objets concernés. De ce fait, un nucléotide, un ARN ou un ribozyme, un peu plus vivants que l'inerte selon l'indice de vie de Bruylants *et al.*, auraient un degré de vie égal à 0 selon cette échelle (pour une critique de ce modèle, voir ²⁹).

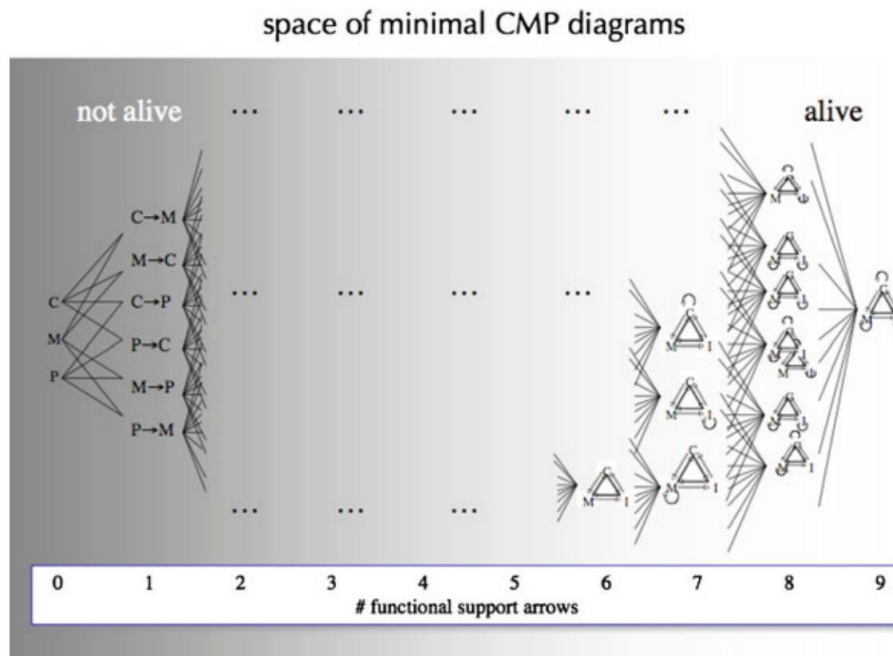


Figure 4. Espace de degrés de vie sur la base de systèmes chimiques CMP variables. $2^9 = 512$ systèmes CMP différents peuvent exister. Les systèmes absolument non vivants comprennent des sous-systèmes de compartimentation (C), de métabolisme (M) et de programme (P) qui ne s'auto-entretiennent pas (flèches circulaires) et qui ne sont pas liés par des relations fonctionnelles d'entretien les uns avec les autres (flèches rectilignes). Figure reprise de ^{34,1}

Une autre proposition de quantification de l'espace de degrés de vie a récemment été élaborée, par le biais de fouilles de textes de plus de 30 000 articles scientifiques pour révéler qu'elle pourrait être la répartition d'objets selon un axe du non-vivant au vivant implicitement présente dans la littérature scientifique. Cet exercice de philosophie expérimentale utilise des algorithmes de modélisation de sujets (*topic-modeling algorithms*) pour identifier le degré d'attribution de huit propriétés spécifiques à différents objets, dont les résultats sont présentés en figure 5.

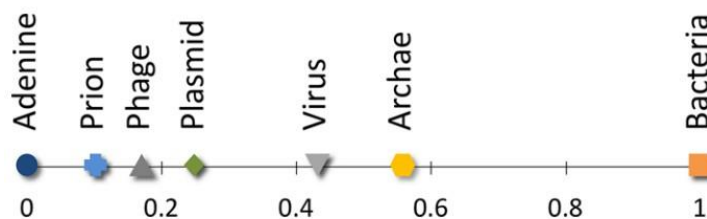


Figure 5. Axe de degré de vie établi par fouille de texte. Cet axe est calibré en attribuant un degré de vie nul à l'alanine et un degré de vie maximale égal à 1 à la bactérie. La répartition des objets et leur valeur de degré de vie est le résultat d'une étude algorithmique expérimentale sur la littérature scientifique. Des résultats étonnants comme le faible degré de vie des archées, pourtant considérées comme êtres vivants par l'ensemble des biologistes, pourraient indiquer

¹ Le sous-système relatif au programme P est indiqué par la lettre « I » (comme « Information ») dans la figure à partir de la valeur 6.

une considération implicite de la part des chercheurs sur un moindre degré de sophistication. Figure reprise de ³⁵.

Enfin, le chapitre 6 de cette thèse propose une façon de quantifier l'espace de degrés de vie par le nombre de seuils qu'un système a franchi pour atteindre un état plus ou moins vivant.³⁶

1.3. Chronologie de la quête de l'origine et de la fabrication de la vie

1.3.1. La génération spontanée

La génération spontanée, c'est-à-dire la possibilité de transitions naturelles de l'inerte au vivant, est théorisée dès l'Antiquité par des philosophes comme Aristote qui affirme que des animaux émergent de la décomposition de la terre et du fumier³⁷ ou comme Lucrèce qui suppose que de l'eau de pluie soumise à la chaleur du soleil engendre une multitude d'êtres vivants.³⁸ La génération spontanée apparaît encore comme factuelle au Moyen-Âge où les philosophes Albert le Grand et Thomas d'Aquin affirment que la chaleur et la lumière du soleil font émerger végétaux, grenouilles et serpents de la terre ou de la matière en décomposition.^{39,40}

À partir de la fin du XVII^{ème} siècle, les méthodes d'investigations empiriques se développent de plus en plus et la génération spontanée n'échappe pas à l'expérience. Ainsi, le chimiste belge Jean-Baptiste Van Helmont, crédité pour avoir entamé le passage de l'alchimie à la chimie, rapporte avoir éprouvé empiriquement cette théorie. La mise en contact d'une chemise sale et de grains de blé dans un récipient aurait généré des souris au bout d'une vingtaine de jours, sous l'action de la sueur sur le blé.⁴¹ Le médecin italien Francesco Redi fait au contraire quelques années plus tard l'observation empirique de l'absence de génération spontanée. En laissant deux morceaux de viande se décomposer dans des vases, l'un à l'air libre, l'autre recouvert d'un fin tissu, il n'observe l'apparition d'asticots que sur le premier sur lequel les mouches ont pu pondre des œufs.⁴² Cette observation n'est pas pour autant fatale à la théorie de la génération spontanée qui se voit renforcée par l'invention du microscope et la découverte des micro-organismes,⁴³ puis par la théorie des « molécules organiques » de Buffon.⁴⁴ Selon le naturaliste français, les êtres-vivants sont composés de particules élémentaires spécifiques, à savoir des « molécules organiques » (à ne pas confondre avec l'acception actuelle du terme), qui s'éparpillent au moment de la mort d'un organisme, puis se réorganisent graduellement pour en former de nouveaux.

La première controverse sur la génération spontanée a lieu durant la seconde moitié du XVIII^{ème} et oppose le biologiste anglais John Needham au biologiste italien Lazzaro

Spallanzani.⁴⁵ Le premier rapporte ainsi avoir démontré l'émergence de micro-organismes suivant un protocole expérimentale jugé rigoureux.⁴⁶ Il remplit une fiole avec du jus de viande chauffé, la ferme hermétiquement puis réchauffe la fiole. Quatre jours plus tard il observe la prolifération de micro-organismes dans le jus de viande auquel il prête une « force végétative » partagée avec l'ensemble de la matière organique, et capable d'initier la vie. Cependant, Spallanzani n'est pas convaincu de l'interprétation et critique le protocole sur la durée et l'intensité du chauffage. Il reproduit alors l'expérience avec 19 fioles, chauffées à 100°C pendant une heure et n'observe aucune apparition de micro-organismes.⁴⁷ Needham rétorque que les conditions extrêmes de chauffage du biologiste italien détruisent la force végétative du jus, ce qui empêche toute génération spontanée d'advenir. De son côté, Spallanzani associe cette force végétative à un « ouvrage de pure imagination ». ⁴⁸ Aucun argument ou expérience ne vient réellement clore le débat, jusqu'à la célèbre controverse un siècle plus tard entre le biologiste Félix Archimède Pouchet et le chimiste Louis Pasteur. Pendant quelques années les deux scientifiques livrent bataille par expériences interposées. Le premier montre la génération de filaments de champignons à partir de petites bottes de foin dans des conditions supposées stériles, et le second montre l'absence de génération spontanée en élaborant le protocole expérimental. Pasteur associe par ailleurs les quelques résultats positifs qu'il obtient lui-même à des contaminations atmosphériques, et la controverse est finalement tranchée par l'Académie de Sciences en 1860 à la faveur du chimiste, ce qui porte un coup d'arrêt définitif à la théorie de la génération spontanée dans le milieu académique. Les historiens John Farley et Gerald Geison interprètent la résolution de cette controverse non pas à une décision éclairée par les connaissances scientifiques de l'époque mais à des facteurs sociaux et des prises de partie religieuses et philosophiques.⁴⁹ En effet, l'association de la théorie de l'évolution, tout juste publiée par Darwin, à la génération spontanée entraîne une conséquence désastreuse pour le catholicisme qui imprègne la société française de l'époque. Lors de sa conférence à la Sorbonne en 1864, Pasteur s'exprime ainsi en ces termes :

« Quel triomphe, messieurs, ce serait pour le matérialisme s'il pouvait affirmer qu'il repose sur le fait établi que la matière s'organise, prend la vie d'elle-même ; matière qui a déjà en elle toutes les forces ! Ah ! Si nous pouvions lui ajouter cette autre force qui s'appelle la vie, quoi de plus naturel que de déifier cette matière ? (...) À quoi bon alors l'idée d'un Dieu-créateur ? Admettez donc, Messieurs, la doctrine de la génération spontanée, et l'histoire de la création et de l'origine du monde organique n'est pas plus difficile que cela. Prenez une goutte d'eau de mer, qui contient un peu de matière azotée, un peu de mucus marin, un peu de "gelée fertile" comme on l'appelle, et au milieu de cette matière inanimée, les premiers êtres de la création prennent naissance spontanément, puis peu à peu se transforment et montent de rang en rang - par exemple, aux insectes en 10 000 ans et sans doute aux singes et à l'homme au bout de 100 000 ans. Comprenez-vous maintenant le lien qui existe entre la question de la génération spontanée et les grands problèmes que j'ai énumérés au début ? »⁴⁹

Si la résolution de cette controverse porte un coup fatal à la théorie de la génération spontanée, elle n'empêche pas l'acceptation générale de la théorie de l'évolution de Darwin qui a une implication majeure : tous les êtres vivants sont reliés par des liens de parentés historiques et

descendraient d'une même entité primordiale. L'abiogénèse, c'est-à-dire la transition de l'inerte au vivant, a vraisemblablement eu lieu à l'origine historique de la vie, et Darwin confie dans une lettre en 1871 :

« Mais si (et quel gros si !) nous pouvions concevoir dans quelque petite marre chaude, avec toutes les espèces de sels d'ammoniaque et de phosphore, de la lumière, de la chaleur, de l'électricité, etc., en présence, qu'un composé protoïque était là chimiquement formé, prêt à subir des changements plus complexes encore, une telle matière serait aujourd'hui instantanément dévorée ou absorbée, ce qui n'aurait pas été le cas avant que des créatures vivantes n'eussent été formées. »⁵⁰

1.3.2. Evolution chimique du non-vivant au vivant

La déduction d'une origine unique de la vie s'ajoute à l'accumulation des résultats de chimie organique montrant la possibilité de synthétiser les molécules organiques constitutives du vivant à partir de molécules inorganiques du monde minéral, établissant des ponts entre les deux mondes. Wöhler synthétise l'urée en 1828,⁵¹ Strecker l'alanine en 1850,⁵² et Butlerov une série de glucides en 1861.⁵³ Le concept d'évolution chimique du non-vivant au vivant fait surface et des scénarios d'origine de la vie commencent à être dressés, comme celui proposé en 1907 par le biologiste allemand Ernst Haeckel.⁵⁴ Des hydrocarbures se formeraient sur la terre en fusion qui, après refroidissement de la surface, se transforment en une série de nitrocarbures. Au contact d'une atmosphère riche en eau et en acide carbonique, ces derniers se transforment en protéines. Celles-ci s'associent en édifices moléculaires complexes pour former une gelée homogène qui finit par se diviser en sphères entourées d'une écorce solide, pour enfin évoluer vers des cellules simples à noyau.

Le physicien étatsunien Leonard Troland propose quant à lui en 1916 que l'apparition soudaine dans l'océan d'une molécule assimilable à une enzyme, porteuse d'information génétique, capable de se répliquer et d'apporter en même temps des modifications chimiques à toute une autre série de molécules serait à l'origine de la vie. Cette molécule serait alors pour Troland une véritable « molécule vivante ».¹

Le scénario d'abiogénèse le plus complet et le plus connu de ce début de siècle est sans nul doute celui du biochimiste soviétique Alexander Oparin, énoncé pour la première fois en 1924,⁵⁵ et dont l'auteur est aujourd'hui considéré comme un véritable père fondateur de la recherche sur l'origine de la vie. Son scénario est le suivant. La Terre primitive est le théâtre d'une synthèse organique généralisée dans ses océans dont les produits finissent par

¹ Le chapitre 5.2 démontre expérimentalement que toutes ces caractéristiques se retrouvent formellement dans la molécule *Azoarcus*.

s'accumuler en un immense gel colloïdal. Au fur et à mesure des réactions chimiques et des tensions physiques, certaines parties du gel précipitent pour former les premiers « individus ».

Les morceaux de gels les « mieux organisés » croissent et se divisent avec hérédité, et les morceaux les moins adaptés se désintègrent.¹ Au bout d'un long processus de sélection naturelle, les individus se perfectionnent dans l'assimilation de matière organique encore présente sur la surface de la Terre jusqu'à développer de véritables métabolismes pour l'incorporer au mieux et en tirer de l'énergie. Cette consommation de plus en plus rapide de matière organique issue de la synthèse généralisée primordiale épuise alors totalement les stocks disponibles, ce qui amorce une compétition entre les individus qui développent deux stratégies. Certains continuent à incorporer les molécules organiques extérieures mais en se nourrissant d'autres individus, ils restent hétérotrophes, et d'autres développent la capacité de synthétiser cette matière en eux à partir du gaz carbonique atmosphérique, ils deviennent autotrophes.

Sans avoir connaissance des travaux d'Oparin, le biochimiste britannique John Haldane élabore en 1929 un scénario d'abiogenèse différent mais tout aussi déterminant que celui d'Oparin pour la constitution des études de l'origine de la vie comme discipline,⁵⁶ et qui met aussi l'accent sur une évolution chimique graduelle.

Parallèlement à la recherche de scénarios de l'origine de la vie historique, le début du XX^{ème} siècle est marqué par l'ambition de vouloir fabriquer la vie en laboratoire. Le biologiste étatsunien Jacques Loeb déclare en 1912 que « nous devons soit réussir à produire la matière vivante artificiellement, soit trouver les raisons de son impossibilité ».⁵⁷ Pour le biologiste français Stéphane Leduc, cette entreprise est l'aboutissement de toute science naturelle qui commence par l'observation et la classification, puis par la compréhension des mécanismes des phénomènes sous-jacents et enfin par la reproduction synthétique de de ces derniers.⁵⁸ La même année, il publie « La biologie synthétique »⁵⁹ où il y expose ses expériences de création de ce qu'on appelle aujourd'hui des jardins chimiques (figure 6) et qu'il assimile alors à des êtres vivants primitifs. Il décrit les phénomènes de croissance et de reproduction qu'il observe comme ceci :

« La première cellule donne naissance à une deuxième cellule ou vésicule, et celle-ci à une troisième, et ainsi de suite, de sorte que nous obtenons finalement une association de cavités cellulaires microscopiques, séparées par des parois osmotiques - une structure complètement analogue à celle que nous rencontrons dans un organisme vivant. »⁵⁹

¹ Le chapitre 4.2 démontre d'ailleurs expérimentalement la croissance et la division, avec une certaine forme d'hérédité, de protocellules les mieux adaptées

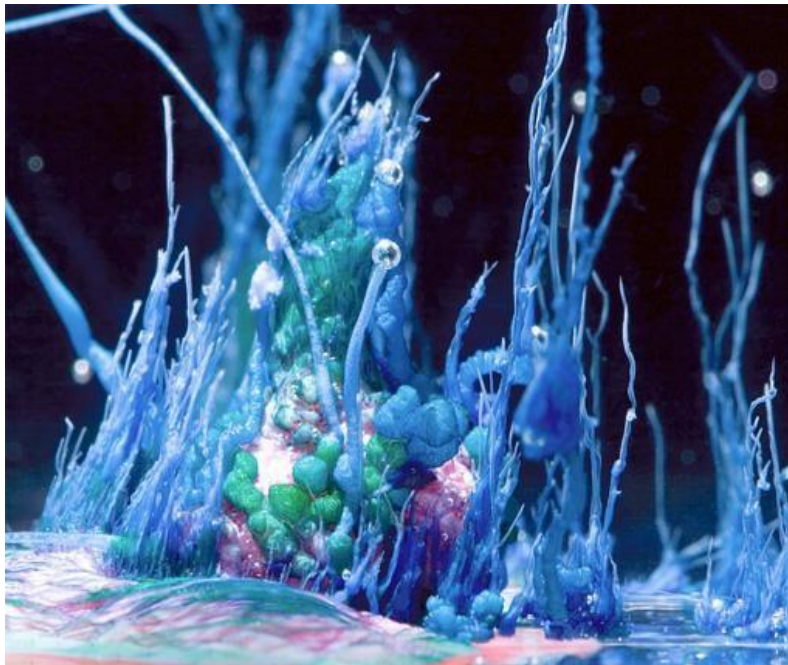


Figure 6 Jardins chimiques. Structures minérales dynamiques issues de réactions entre des ions métalliques et du silicate de sodium dans de l'eau. Découverts par le biologiste français Stéphane Leduc, ce dernier les assimile à des êtres vivants en devenir.¹⁰ Crédits : Stéphane Querbes

Cependant ces formes sont totalement inorganiques et ne convainquent pas le milieu académique de leur pertinence pour expliquer ou reproduire l'abiogénèse. Mais pour le biologiste, ces entités ont bien franchi une bonne partie de la zone grise entre l'inerte et le vivant : « Une seule fonction reste à réaliser pour achever la synthèse de la vie : la production en série. Je considère ce problème comme du même ordre que ceux que j'ai déjà résolus ». ⁶⁰ La raison pour laquelle Leduc est si convaincu d'avoir synthétisé des formes de vie peut prendre sa source dans la conception de la vie qu'il expose en considérant la morphogénèse, c'est-à-dire la création de formes nouvelles d'un organisme, comme étant « la caractéristique centrale des êtres vivants ». Ces jardins chimiques présentant un tel phénomène, il est alors naturel de les interpréter comme proches du vivant (pour plus de détails sur les travaux de Leduc et sa réception, voir ¹⁰).

L'acte de naissance de la discipline de la chimie prébiotique, c'est-à-dire de la synthèse des principales molécules du vivant dans les conditions supposées de la terre primitive, est signée par l'expérience du biochimiste Stanley Miller en 1953 publié dans la revue *Science* et qui détonne à l'international. ^{61,62} Il fait transiter un mélange d'eau, de méthane, d'ammoniac et de dihydrogène à l'intérieur d'un dispositif de verrerie en circuit clôt où la mixture est successivement bouillie et soumise à des décharges électriques (figure 7). Cette expérience censée mimer les conditions de la Terre primitive aboutit à la formation d'une poignée d'acides aminés, briques élémentaires des protéines. À partir de là, des expériences de ce type vont se succéder, en passant par la synthèse de l'adénine, composé essentiel de l'ADN, par le biochimiste Joan Oró, ⁶³ jusqu'à aboutir bien plus tard à la proposition d'un cadre unifié de

synthèse prébiotique des principales familles de biomolécules par le chimiste britannique John Sutherland.⁶⁴

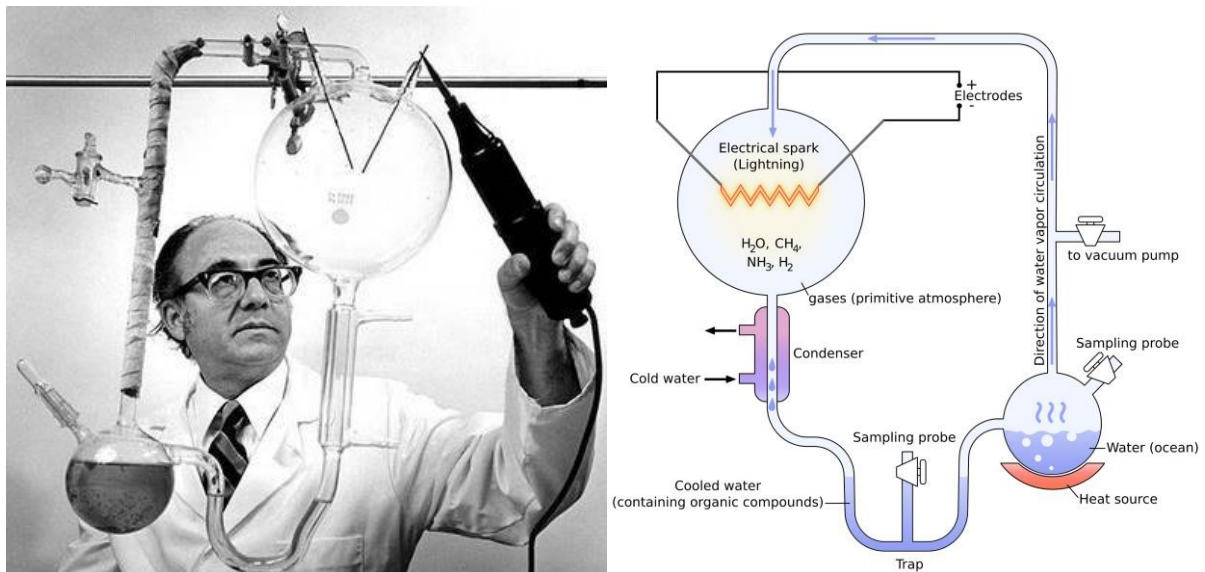


Figure 7. L'expérience de Miller. À gauche. Stanley Miller reproduit son expérience de chimie prébiotique avec le dispositif qu'il a conçu en 1953. Crédits : universe-review. À droite. Schéma du dispositif expérimental qui a permis la synthèse spontanée d'acides aminés dans les conditions supposées de la Terre primitive. Crédits : Yassine Mrabet

Les progrès en chimie prébiotique ont montré que les principales biomolécules pouvaient en principe apparaître spontanément dans certaines conditions. Cependant, il est de plus en plus consensuel de concevoir le vivant non comme un collectif de molécules spécifiques mais comme un processus spécial⁶⁵ que les synthèses de biomolécules n'amorcent aucunement.

Dans la fin des années 1960, une ligne de recherche apparaît sur la théorisation et la fabrication de systèmes biomoléculaires capables d'évolution darwinienne. Ce type d'évolution caractérise une dynamique qui combine les propriétés de reproduction avec hérédité, de variation et de sélection⁶⁶ et s'inscrit dans l'ensemble des processus les plus distinctifs du vivant.²² La première expérience de ce type est menée par le biologiste étatsunien Sol Spiegelman en 1967 et aboutit à l'émergence d'une espèce d'ARN connue sous le nom du « monstre de Spiegelman ».⁶⁷ L'article qui retranscrit l'expérience entend répondre à la question suivante : « Qu'arrivera-t-il aux molécules d'ARN si la seule demande qui leur est faite est l'injonction biblique de se multiplier, avec la condition biologique qu'elles le fassent aussi rapidement que possible ? ». En transférant des ARN qui sont répliqués par des protéines de tube en tube, les auteurs de l'étude s'aperçoivent que la séquence de l'ARN s'est transformée et que 83% du génome original a été éliminé. Cela signifie que la nouvelle espèce d'ARN a subi une évolution darwinienne pour devenir une molécule capable d'être répliquée le plus vite possible. Ce genre d'espèces moléculaires dont la seule aptitude est la répllication, est interprété comme des « parasites » dans les systèmes expérimentaux qui visent à reproduire l'évolution darwinienne hors du vivant. En effet elles détournent les assemblages moléculaires de leurs fonctions au seul profit de leur

propre réplication, entraînant ainsi la destruction du système, à la manière d'un virus (voir l'article ⁶⁸ analysé dans le chapitre 3.2).

En 1971, deux articles publiés par le biophysicien allemand Manfred Eigen⁶⁹ et le biologiste étatsunien Stuart Kauffman⁷⁰ posent les bases théoriques de la recherche sur l'abiogenèse d'un point de vue évolutif. Les biomolécules élémentaires sont supposées être déjà formées et le vivant émerge par l'apparition de réseaux de réactions dynamiques sous la forme d'hypercycles⁷¹ ou d'ensembles de polymères collectivement autocatalytiques.⁷² Par ailleurs, la découverte des capacités catalytiques de l'ARN dans les années 1980⁷³ propulse cette molécule sur le devant de la scène comme candidate pour figurer parmi les premières biomolécules de l'origine de la vie car capable d'assurer les fonction de stockage d'information de l'ADN ainsi que les fonctions catalytiques des protéines. Dans le cadre de ce qui est maintenant appelé « le monde à ARN », ⁷⁴ cette molécule est utilisée pour tester expérimentalement, avec ou sans protéines, les théories d'Eigen et Kauffman, comme avec le système Azoarcus.^{75,1}

Aujourd'hui la recherche sur l'origine historique de la vie et sur la fabrication de la vie en laboratoire a accompli des progrès certains mais de nombreuses questions restent en suspens, quoique mieux identifiées, comme montré dans le chapitre 6.^{viii}

1.3.3. Une recherche contemporaine interdisciplinaire

Aujourd'hui, la recherche sur la transition de l'inerte au vivant se fait sous différents angles d'exploration, résultant de différentes interprétations de la question (comme discuté au chapitre 2) et liés aux différentes appartenances disciplinaires des chercheurs concernés. Ainsi, nous pouvons distinguer les approches suivantes : micropaléontologie, chimie prébiotique, cellules artificielles, cellules minimales, exobiologie et vie artificielle.

La recherche de l'explication de l'origine de la vie historique sur Terre mobilise par exemple particulièrement les géologues et les chimistes. Il s'agit de trouver les plus anciennes traces de vie, par la recherche de biosignatures, et d'établir les conditions géochimiques (atmosphères réductrices ou oxydantes, présence de minéraux catalytiques etc), les conditions physiques (volcanisme, chute de météorite etc), et les conditions climatiques (pluie, gel etc) afin de dresser le paysage de la terre primitive avant qu'elle ne porte la vie, c'est à dire d'établir des conditions dites « prébiotique ». Cette approche se combine avec la chimie prébiotique qui consiste à synthétiser les molécules élémentaires du vivant (acides aminés, acides gras, glucides, nucléotides) ainsi que leur polymère et assemblages (protéines, lipides, ADN, ARN), tout en étant le plus contraint possible par les conditions prébiotiques supposées. La chimie prébiotique

¹ Pour plus de détails sur le système Azoarcus et les théories et expériences liées aux réseaux biomoléculaires évolutifs, voir chapitres 5.1 et 6. ^{viii} Pour une revue de littérature transversale sur les derniers résultats du domaine, voir ⁷⁶.

comprend aussi, mais de façon plus marginale, la mise en place de protométabolismes (cycles de réactions présentant les fonctions d'un métabolisme primitif) dans les mêmes conditions prébiotiques.⁷⁷

Une autre ligne de recherche consiste à s'affranchir totalement des conditions prébiotiques pour ne se fixer comme seul objectif la compréhension de la transition de l'inerte au vivant dans l'absolu ainsi que sa fabrication en laboratoire avec tous les outils disponibles. Cette approche regroupe une multitude de recherches que l'on peut rassembler autour de quelques pôles. La communauté de recherche sur les cellules dites artificielles (ou synthétiques) vise à construire, du simple au complexe, une entité qui se rapproche le plus des cellules biologiques, avec une insistance prononcée sur la propriété d'auto-entretien. L'entreprise complémentaire consiste à retirer et modifier des éléments préexistants de cellules biologiques pour aboutir à des cellules dites minimales. Cette approche s'inscrit dans la discipline de la biologie de synthèse actuelle (à ne pas confondre avec la biologie synthétique de Stéphane Leduc). Un objectif important de ces deux entreprises, qui sont principalement menées par des biochimistes et des biologistes moléculaires, serait de joindre les deux bouts, c'est-à-dire d'aboutir à des cellules artificielles proche des cellules minimales. Il est par ailleurs possible d'élargir l'approche synthétique de la recherche sur la transition de l'inerte au vivant en élargissant le concept de vie dont les êtres vivants sur terre ne serait qu'un exemple. C'est ainsi que des chimistes sont impliqués dans la mise en œuvre de systèmes ne comprenant aucune biomolécule, voir étant totalement inorganique, pour tendre vers un vivant nouveau.⁷⁸

Cet exercice pratique et conceptuel s'avère même être une exigence dans la recherche en exobiologie (*astrobiology* en anglais) dont l'objectif historique est la détection de vie dans l'univers. Si de la vie existe ailleurs, rien n'indique qu'elle serait nécessairement semblable à celle que nous connaissons sur Terre, ce qui implique une recherche conceptuelle de ce que pourrait être une autre forme de vie.⁷⁹ L'exobiologie est hautement interdisciplinaire et comprend des recherches sur la transition de l'inerte au vivant dans divers conditions physicochimiques, et d'autres sur la capacité de diverses formes de vie à habiter des environnements variés répartis dans l'univers. Aujourd'hui l'étiquette exobiologique est bien plus populaire dans le milieu académique que celle de la chimie prébiotique, de par le fort appui institutionnel de la NASA notamment.⁸⁰ Ainsi, plusieurs recherches qui traitent de la question de l'origine historique de la vie sur Terre se réclament de l'exobiologie pour des raisons financières et institutionnelles. Les articles paraissant aujourd'hui dans *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, la plus vieille revue académique spécialisée sur l'origine de la vie et éditée depuis 1968 par la société internationale sur l'étude des origines de la vie (*The International Society for the Study of the Origin of Life*, raccourci en ISSOL), sont entre 2 et 4 fois moins cités que ceux paraissant dans *Astrobiology* qui n'existe que depuis 2001. Conscient de cette montée en popularité de l'exobiologie, l'ISSOL change même de nom en 2005 pour devenir officiellement *The International Society for the Study of the Origin of Life – The International Astrobiology Society*.

Bien que très éloignée des recherches précédentes de par ses méthodes et ses concepts, la recherche en vie artificielle informatique s'inscrit aussi dans une exploration de la transition de

l'inerte au vivant. Au sein de cette discipline initiée par l'informaticien étatsunien Christopher Langton dans la fin des années 1980, le vivant se conçoit comme pouvant réellement émerger sous la forme de programmes informatiques qui ne seraient pas que de simples simulations.⁸¹

Le vivant n'est donc ici pas nécessairement chimique mais peut se révéler *in silico*, ce qui illustre le poids des conceptions de la vie sur ces pratiques de recherche.

L'interdisciplinarité est une nécessité et un réel défi pour la recherche sur l'origine de la vie.¹ Malgré plusieurs initiatives de programmes de recherche interdisciplinaire sur le sujet, des chercheurs inclus dans ces mêmes programmes font le constat que les travaux qui y sont financées sont plus de l'ordre de la multidisciplinarité. Ainsi les différentes disciplines travailleraient chacune de leur côté pour ne présenter leurs travaux collés bout à bout que dans un rapport commun ou au mieux lors d'une conférence commune.⁸² Au contraire plusieurs programmes de recherche affichent une forte interdisciplinarité comme l'ELSI Origins Network de l'institut technologique de Tokyo, l'Origins of Life Initiative de l'université Ludwig-Maximilians de Munich ou encore le programme OCAV de l'université PSL dans lequel cette thèse s'inscrit. La nécessité d'interdisciplinarité est de plus en plus prise au sérieux par les acteurs de cette recherche dont l'un des outils est la tenue de conférences et d'écoles d'été (ou d'hivers), comme la « Arizona NExSS Winter School on Astrobiology » dont les organisateurs ont mesuré les acquis de nouvelles connaissances de doctorants en astrophysique et en géologie.⁸³

Une difficulté particulièrement forte est la prise en compte de conceptions divergentes de la vie, suivant les disciplines, qui influent grandement les travaux. Comme vu précédemment, Stéphane Leduc prenait ses créations de formes minérales au XX^{ème} siècle comme des êtres vivants en devenir sur la base que la morphogenèse était la propriété essentielle de la vie selon lui. Plus récemment, la publication d'un article en 2010 dans la très prestigieuse revue *Science* attestant la découverte de bactéries ayant de l'arsenic à la place du phosphore dans leur ADN a été à l'origine d'une controverse opposant géochimistes et biologistes.⁸⁴ Pour les premiers, l'atome d'arsenic ayant des propriétés similaires à celui du phosphore dans le tableau périodique des éléments, il n'y a pas d'obstacle pour supposer qu'une partie des êtres vivants ait incorporé le premier au lieu du second dans leur ADN. Pour les biologistes, selon lesquelles tous les êtres vivants sont apparentés et fonctionnent avec exactement les mêmes biomolécules, il apparaît inconcevable de supposer une telle forme de vie sur Terre, et l'histoire leur donnera finalement raison. En étant attentif à cette difficulté de l'interdisciplinarité, le biochimiste étatsunien Steven Benner en appelle ainsi à agir en « "anthropologue" des sciences » (figure 8)⁸⁵ concernant la recherche sur l'origine et la nature de la vie.

¹ Je n'inclue pas la recherche en vie artificielle *in silico* dans cette discussion sur l'interdisciplinarité de par son fort éloignement des autres approches décrites ici.



Figure 8. L'anthropologue des sciences, selon le biochimiste Steven Benner. Figure reprise de ⁸⁶.

1.4. L'approche de l'anthropologie des sciences

L'anthropologie des sciences peut se définir comme « l'étude de la manière dont la connaissance scientifique émerge de formes plus larges de vie culturelle, sociale et politique, et les conditionnent. ».⁸⁷ Elle se comprend à travers une double généalogie relative aux ethnosciences issues des travaux de la sociologie des sciences et de l'anthropologie.^{88,1}

1.4.1. Développement historique de l'approche anthropologique

L'anthropologie, étymologiquement « l'étude de l'humain », vise à comprendre l'humain dans son unité et sa diversité et emprunte par cela deux canaux différents qui divergent à la fin du XIX^{ème} siècle. D'une part, l'anthropologie biologique (ou physique) étudie les variations morphologiques des hommes à travers l'espace et le temps, et d'autre part l'anthropologie

¹ Cette section est en partie redevable d'un cours donné par Sophie Houdart à l'EHESS le 13/04/21.

sociale (ou culturelle) étudie les variations sociales et culturelles des groupes humains répartis sur toute la Terre. L'un des premiers anthropologues à revendiquer cette approche culturelle est le britannique James Frazer qui dresse un important inventaire de mythes et de rites dans un ouvrage en plusieurs volumes paru à partir de 1890.⁸⁹ Son ouvrage est aujourd'hui très critiqué et relève de ce qui est communément appelé de « l'anthropologie de chambre » (*armchair anthropology*), car Frazer n'a jamais observé les pratiques qu'il décrit, mais s'est appuyé sur des récits de voyageurs dont les approximations et les préjugés étaient nombreux.⁹⁰

La forme que revêt actuellement l'anthropologie tire particulièrement son origine des travaux du britannique d'origine polonaise Bronisław Malinowski qui part en 1914 pour observer directement l'organisation sociale et les pratiques culturelles d'indigènes des îles Trobriand de l'actuelle Papouasie Nouvelle Guinée. Mais au moment de s'installer, la Première Guerre Mondiale éclate et l'anthropologue n'a pas l'autorisation de revenir au Royaume-Uni. Ce qui devait être un séjour d'observation de quelques mois se transforme alors en une immersion de quatre ans chez les indigènes. Durant son séjour, l'anthropologue coupe les ponts avec le monde extérieur, vit jours et nuits chez ses hôtes dont il apprend la langue, et s'implique dans la plupart des activités du groupe. En faisant une description précise de ses observations sur un carnet de terrain, il amorce la méthode centrale de l'anthropologie contemporaine : l'observation participante. À la fois observateur et acteur des pratiques qu'il retranscrit, il se vide le plus possible de ses catégories conceptuelles préalables pour partir des faits qu'il observe et essayer de comprendre le monde comme le font ses informateurs indigènes.⁹¹ Ainsi l'anthropologie se distingue par exemple de la sociologie jusqu'à ce jour par son ambition de retranscrire qualitativement le fonctionnement des groupes étudiés depuis l'intérieur, et en s'attachant à retranscrire leur façon de théoriser le monde et d'interagir avec selon leur propre point de vue subjectif. De son côté, la sociologie, dont les frontières avec l'anthropologie restent poreuses, peut comprendre une vocation à l'objectivité sur le fonctionnement des sociétés et faire appel à des méthodes plus quantitatives comme l'analyse statistique. Il est aussi utile de préciser la différence entre « anthropologie » et « ethnologie », termes parfois utilisés de façon interchangeable, et qui se situe principalement au niveau de l'échelle d'analyse. L'ethnologie analyse les pratiques sociales de groupes ethniques précis, alors que l'anthropologie a la vocation de les étudier à l'échelle de l'humanité en comparant les travaux issus de l'ethnologie entre eux. Enfin l'ethnographie désigne la retranscription des observations de l'ethnologue (ou de l'anthropologue) issues d'une immersion qui peut prendre la forme d'une observation participante.

À partir de 1936, le français Marcel Mauss, aussi bien décrit comme sociologue qu'anthropologue, puis le français André Leroi-Gourhan, mettent l'accent sur l'étude des techniques définies comme des « actes traditionnels efficaces »,⁹² pour comprendre l'humain en interaction avec son milieu,⁹³ fondant alors la discipline de l'anthropologie des techniques.¹ De l'autre côté de l'Atlantique, l'anthropologue George Peter Murdock forge le terme « ethnoscience » en 1950 pour « désigner l'étude des catégories de pensée qui, dans les différentes

¹ La revue *Techniques et Culture*, dans laquelle le texte original du chapitre 4.1 a été publié, est la revue francophone emblématique de ce courant de pensée.

sociétés, organisent, classent, hiérarchisent, distinguent les relations entre l'homme et la nature, entre l'homme et l'animal ». ⁸⁸ Émergent alors « l'ethnomédecine », « l'ethnobotanique » ou encore « l'ethnozoologie » pour étudier les techniques et les savoirs développés localement à travers le monde pour comprendre et interagir avec la santé, les plantes ou les animaux. Dans cette mouvance, Claude Lévi-Strauss montre que les systèmes de compréhension du monde des indigènes non occidentaux ne sont pas « prélogiques » mais que la « pensée sauvage », comme il la désigne, est rationnelle et « trouve son principe dans une science du concret, une logique des qualités sensibles ». ⁹⁴ Héritier de Lévi-Strauss, Philippe Descola fonde une approche connue sous le nom d'anthropologie de la nature et démontre la contingence de l'opposition entre culture et nature établie en Occident. Ses travaux montrent différents modes d'interprétation de la nature et des êtres vivants à travers le monde (animisme, totémisme, naturalisme, analogisme) et dont le point de vue occidental scientifique, même dans toute sa diversité, n'en est qu'un parmi d'autres. ⁹⁵

Dans la continuité des travaux de Descola et de l'anthropologie des techniques, Perig Pitrou propose une anthropologie de la vie qui consiste à comprendre les façons dont les groupes humains conçoivent la vie aux regards de leurs dispositifs techniques et institutionnels. ⁹⁶ À partir de son ethnographie de pratiques sacrificielles chez les Mixes au Mexique, il propose par exemple d'interpréter la vie comme un « processus de fabrication » lors de rites agricoles ou de naissance. ⁹⁷ Aux travaux ethnographiques qui montrent les façons de comprendre les processus vitaux, s'ajoutent ceux qui révèlent comment est interprété localement la frontière entre l'inerte et le vivant. Ainsi des études de terrain au sein de luttes contre les incendies au Brésil dévoilent la « vitalité » du feu, ⁹⁸ et des enquêtes auprès des aborigènes d'Australie révèlent le caractère « vivant » de certains paysages, dont la destruction par des entreprises d'extraction minières provoque de terribles traumatismes pour les peuples indigènes. ⁹⁹

1.4.2. Comprendre la recherche scientifique par l'ethnographie de laboratoire

À partir des années 1970, des anthropologues et des sociologues font le constat d'un savoir grandissant sur les fonctionnements des sociétés traditionnelles non occidentales qui, par contraste, révèle l'ignorance de l'anthropologie sur les groupes culturels occidentaux. Parmi eux, le monde de la recherche académique et le laboratoire de sciences apparaissent comme une « citadelle » qui échapperait à l'emprise de la société, un monde d'objectivité et dépourvu de culture. ¹⁰⁰ C'est avec un esprit de défi, qu'après ses travaux en Côte d'Ivoire, l'anthropologue Bruno Latour s'installe en 1976 dans un laboratoire de neuroendocrinologie étatsunien pour y mener une observation participante et « investir la forteresse, le noyau dur de la science ». En se dépouillant le plus possible de tout concept préalable, et en ne se fiant qu'à l'observation ethnographique couplée à son activité de technicien de laboratoire, il étudie la « production sociale des faits scientifiques », c'est-à-dire le passage de faits hypothétiques à des faits avérés

le long d'un processus tortueux d'expériences, d'analyses, d'interprétations, de négociations et de justifications au sein de la communauté des chercheurs du laboratoire étudié.¹⁰¹ L'objectif est de restituer « la science en train de se faire », c'est-à-dire le « contexte de découverte », qui diffère de la restitution des faits scientifiques, c'est-à-dire le « contexte de justification ».

Par la suite, les ethnographies de laboratoire s'enchaînent et deviennent une méthode privilégiée du courant des *Sciences and Technology Studies* qui forment un programme de recherche interdisciplinaire en sciences sociales se donnant comme objectif d'étudier les processus socioculturels et techniques de la production des connaissances scientifiques et des technologies ainsi que leurs impacts sur la société.¹⁰² Ainsi, en investissant un laboratoire de détection d'ondes gravitationnelles, Harry Collins décrit les difficultés de reproductibilité des expériences et révèle l'importance d'un « savoir tacite ».^{103,104} Et en comparant ses observations de deux laboratoires en physique des hautes énergies d'une part et en biologie moléculaire d'autre part, Karin Knorr-Cetina développe le concept de « cultures épistémiques », qui désignent les ensembles de références, de comportements et de codes qui fédèrent dans un domaine d'expertise donné la manière dont les individus produisent et interprètent des résultats, mais aussi élaborent et jugent des connaissances.¹⁰⁵ En plus d'être attentif aux individus lors de l'ethnographie, Latour insiste sur l'analyse des objets dits « non-humains » (vivants comme inertes) qui incluent tous les objets avec lesquels les humains sont en interaction.^{106,1} La description et l'analyse de ces réseaux d'acteurs (qui donnent son nom à la « théorie de l'acteur-réseau ») permettraient de mieux comprendre le fonctionnement de la société et celle du laboratoire.

Par ailleurs, les enquêtes ethnographiques dans les laboratoires de sciences du vivant mettent en lumière les relations que les scientifiques tissent avec les êtres vivants qu'ils analysent, modifient et interprètent. Par exemple, Paul Rabinow questionne le géocentrisme, c'est-à-dire l'association de l'essence des êtres vivants à leur génome, dans un laboratoire de génomique français,¹⁰⁷ Stephen Helmreich montre comment des informaticiens interprètent des logiciels comme de véritables formes de vie au Santa Fe Institute,²³ Sophie Houdart explique comment les comportements sexuels de drosophiles mutantes sont interprétés différemment dans des laboratoires de génétique du développement au Japon et en France comme de l'homosexualité ou de l'asexualité,¹⁰⁸ Sophia Roosth décrit les pratiques de reconfigurations génétiques en biologie de synthèse pour la construction d'êtres vivants « améliorés » au MIT,¹⁰⁹ et Natasha Myers dévoile comment des protéines sont tantôt interprétées comme des machines ou comme des formes de vie à part entière dans un laboratoire de cristallographie étatsunien.¹¹⁰

Références

¹ Pour plus d'informations sur l'utilisation des concepts d'humains et non-humains en sciences sociales, voir ¹¹⁴.

1. Aristote. *De l'âme.*; 350BC.
2. Cleland CE. *The Quest for an Universal Theory of Life.* Cambridge: Cambridge University Press; 2019.
3. Descartes R. *L'Homme.* Paris: Charles Angot; 1664.
4. de la Mettrie JJO. *L'Homme Machine.* Leyden: Elie Luzac; 1748.
5. Coleman W. *Biology in the Nineteenth Century: Problems of Form, Function, and Transformation.* Cambridge: Cambridge University Press; 1977.
6. Morgan CL. *Instinct and Experience.* New York: Macmillan; 1912.
7. Mill JS. *A System of Logic.* London: Longmans Green; 1843.
8. Darwin C. *The Origin of Species.* London: John Murray, Albemarle Street; 1859.
9. Watson JD, Crick FH. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1953;18:123-131. doi:10.1101/SQB.1953.018.01.020
10. Keller EF. *Making Sense of Life : Explaining Biological Development with Models, Metaphors, and Machines.* Harvard University Press; 2002.
11. Rosen R. *Essays on Life Itself.* New York: Columbia University Press; 2000.
12. Rosen R. A relational theory of biological systems. *Bull Math Biophys.* 1958;20(3):245-260. doi:10.1007/BF02478302
13. Ganti T. *The Principles of Life.* Oxford: Oxford University Press; 2003.
14. Letelier JC, Cárdenas ML, Cornish-Bowden A. From L'Homme Machine to metabolic closure: Steps towards understanding life. *J Theor Biol.* 2011;286(1):100-113. doi:10.1016/j.jtbi.2011.06.033
15. Moreno A, Mossio M. *Biological Autonomy.* Dordrecht: Springer; 2015.
16. Griesemer J. The enduring value of Gánti's chemoton model and life criteria: Heuristic pursuit of exact theoretical biology. *J Theor Biol.* 2015;381:23-28. doi:10.1016/J.JTBI.2015.05.016
17. Popa R. *Between Necessity and Probability: Searching for the Definition and Origin of Life.* Springer; 2004.
18. Trifonov EN. Vocabulary of definitions of life suggests a definition. *J Biomol Struct Dyn.* 2011;29(2):259-266. doi:10.1080/073911011010524992
19. Lineweaver CH. We have not detected extraterrestrial life, or have we? In: Seckbach J, ed. *Life As We Know It.* Springer; 2006:445-457.
20. Luisi PL. Autopoiesis: A review and a reappraisal. *Naturwissenschaften.* 2003;90(2):49-59. doi:10.1007/s00114-002-0389-9
21. Lancet D, Zidovetzki R, Markovitch O. Systems protobiology: Origin of life in lipid catalytic networks. *J R Soc Interface.* 2018;15(144). doi:10.1098/rsif.2018.0159

22. Joyce GF. Foreword. In: Deamer DW, Fleischaker G, eds. *Origins of Life : The Central Concepts*. Boston: Jones and Bartlett Publishers; 1994.
23. Helmreich S. *Silicon Second Nature*. Berkeley and Los Alamos: University of California Press; 2000.
24. Luisi PL. About various definitions of life. *Orig Life Evol Biosph*. 1998;28(4-6):613622. doi:10.1023/a:1006517315105
25. Machery E. Why I stopped worrying about the definition of life... and why you should as well. *Synthese*. 2012;185(1):145-164. doi:10.1007/s11229-011-9880-1
26. Cleland CE, Chyba CF. Defining 'life.' *Orig Life Evol Biosphere*. 2002;32:387-393.
27. Forterre P. Defining Life: The Virus Viewpoint. *Orig Life Evol Biosph*. 2010;40(2):151-160. doi:10.1007/s11084-010-9194-1
28. Moreira D, López-García P. Ten reasons to exclude viruses from the tree of life. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(4):306-311. doi:10.1038/nrmicro2108
29. Heams T. *Infravies - Le Vivant sans Frontières*. Paris: Editions du Seuil; 2019.
30. Smith HH, Hyde AS, Simkus DN, et al. The Grayness of the Origin of Life. *Life*. 2021;11:498.
31. Malaterre C. Lifeness signatures and the roots of the tree of life. *Biol Philos*. 2010;25(4):643-658. doi:10.1007/s10539-010-9220-8
32. Pascal R, Pross A, Sutherland JD. Towards an evolutionary theory of the origin of life based on kinetics and thermodynamics. *Open Biol*. 2013;3(NOV):1-9. doi:10.1098/rsob.130156
33. Bruylants G, Bartik K, Reisse J. Prebiotic chemistry: A fuzzy field. *Comptes Rendus Chim*. 2010;14(4):388-391. doi:10.1016/j.crci.2010.04.002
34. Bedau MA. A functional account of degrees of minimal chemical life. *Synthese*. 2012;185(1):73-88. doi:10.1007/s11229-011-9876-x
35. Malaterre C, Chartier J-F. Beyond categorical definitions of life: a data-driven approach to assessing liveness. *Synthese*. 2019;198:4543-4572. doi:10.1007/s11229019-02356-w
36. Jeancolas C, Malaterre C, Nghe P. Thresholds in origin of life scenarios. *iScience*. 2020;23:101756. doi:10.1016/j.isci.2020.101756
37. Aristote. *Génération Des Animaux.*; 322BC.
38. Lucrèce. *De Rerum Natura*. (José Kany-Turpin, ed.). Paris: Aubier; 1993.
39. le Grand A. *De Mineralibus.*; 1250.
40. D'Aquin T. *Summa Theologica.*; 1273.
41. Van Helmont J-B. *Les Oeuvres de J.-B. van Helmont Traitant Des Principes de Médecine et de Physique*. Lyon: Huguetan et Barbier; 1671.
42. Redi F. *Esperienze Intorno Alla Generazione Degli Insetti*. Firenze: insegna della stella; 1668.

43. van Leeuwenhoek A. *Opera Omni Seu Arcana Naturae Ope Exactissimorum Microscopiorum Detecta*. Leyden: Joh Arnold Langerak; 1722.
44. Buffon GL. *Histoire Naturelle, Générale et Particulière, Servant de Suite à l'Histoire Naturelle de l'Homme*. Tome quatr. Paris: Imprimerie Royale; 1777.
45. Raulin-Cerceau F. *Les Origines de La Vie*. Histoire d. Paris: éditions ellipses; 2009.
46. Needham J. *Nouvelles Observations Microscopiques Avec Des Découvertes Intéressantes Sur La Composition et La Décomposition Des Corps Organisés*. Paris: Louis Etienne Ganeau; 1750.
47. Spallanzani L. *Nouvelles Recherches Sur Les Découvertes Microscopiques et La Génération Des Corps Organisés*. Paris: Lacombe; 1769.
48. Spallanzani L. *Opuscules de Physique, Animale et Végétale*. Genève: Jean Senebier; 1777.
49. Farley J, Geison GL. Science, politics and spontaneous generation in the nineteenthcentury France: the Pasteur-Pouchet debate. *Bull Hist Med*. 1974;48(2):161-198.
doi:10.3917/rspt.924.0847
50. Darwin F. *The Life and Letters of Charles Darwin*. London: J. Murray; 1887.
51. Wohler MF. Artificial formation of urea. *Philos Mag*. 1828;4(22):309-310.
doi:10.1080/14786442808674820
52. Strecker A. Ueber die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocollo homologen Körper. *European J Org Chem*. 1850;75(1):27-45.
53. Butlerov A. Bildung einer zuckerartigen Substanz durch Synthese. *Ann Chemie*. 1861;120:295-298.
54. Haeckel E. *Les Merveilles de La Vie: Études de Philosophie Biologique Pour Servir de Complément Aux "Énigmes de l'Univers."* Paris: Schleicher Frères; 1907.
55. Oparin A. *Proiskhozhdenie Zhizni*. Moscou: Izd. Moskovskii Rabochi; 1924.
56. Haldane JBS. The Origin of Life. *Ration Annu*. 1929;71:3-10.
57. Loeb J. *The Mechanistic Conception of Life*. The University Of Chicago Press; 1912.
58. Leduc S. *Théorie Physico-Chimique de La Vie, et Génération Spontanée*. Paris: A. Poinat; 1910.
59. Leduc S. *La Biologie Synthétique*. Paris: Poinat; 1912.
60. Leduc S. *Les Bases Physiques de La Vie et La Biogenèse*. Paris: Masson; 1906.
61. Lazcano A. Historical development of origins research. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(11):1-17. doi:10.1101/cshperspect.a002089
62. Miller SL. A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science*. 1953;117(3046):528-529. doi:10.1126/science.117.3046.528
63. Oro J. Synthesis of Adenine from Ammonium Cyanide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1960;2(6):407-412.

64. Patel BH, Percivalle C, Ritson DJ, Duffy CD, Sutherland JD. Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nat Chem.* 2015;7(4):301-307. doi:10.1038/nchem.2202
65. Nicholson DJ, Dupre J. Towards a Processual Philosophy of Biology. In: Dupré J, Nicholson DJ, eds. *Everything Flows: Towards a Processual Philosophy of Biology.* Oxford Uni. Oxford; 2018:9-10. doi:9780198779636
66. Lewontin RC. The units of selection. *Novartis Found Symp.* 1970;213:1-19. doi:10.1146/annurev.es.01.110170.000245
67. Bresch C, Niesert U, Harnasch D. Hypercycles, parasites and packages. *J Theor Biol.* 1980;85(3):399-405. doi:10.1016/0022-5193(80)90314-8
68. Matsumura S, Kun Á, Ryckelynck M, et al. Transient compartmentalization of RNA replicators prevents extinction due to parasites. *Science.* 2016;354(6317):1293-1296.
69. Eigen M. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften.* 1971;58(10):465-523. doi:10.1007/BF00623322
70. Kauffman SA. Cellular homeostasis, epigenesis and replication in randomly aggregated macromolecular systems. *J Cybern.* 1971;1(1):71-96. doi:10.1080/01969727108545830
71. Eigen M, Schuster P. The Hypercycle A Principle of Natural Self-Organization. *Die Naturwissenschaften.* 1977;64:541-565. doi:10.1007/978-3-642-67247-7_1
72. Kauffman SA. Autocatalytic sets of proteins. *J Theor Biol.* 1986;119(1):1-24. doi:10.1016/S0022-5193(86)80047-9
73. Zaug, Arthur J., Cech, Thomas R. The intervening sequence RNA of Tetrahymena is an enzyme. *Science.* 1986;231:470-475.
74. Gilbert W. The RNA world. *Nature.* 1986;319(February):618. doi:10.1038/319618a0
75. Vaidya N, Manapat ML, Chen IA, Xulvi-Brunet R, Hayden EJ, Lehman N. Spontaneous network formation among cooperative RNA replicators. *Nature.* 2012;491(7422):72-77. doi:10.1038/nature11549
76. Ruiz-Mirazo K, Briones C, De La Escosura A. Prebiotic systems chemistry: New perspectives for the origins of life. *Chem Rev.* 2014;114(1):285-366. doi:10.1021/cr2004844
77. Muchowska KB, Varma SJ, Moran J. Synthesis and breakdown of universal metabolic precursors promoted by iron. *Nature.* 2019;569(7754):104-107. doi:10.1038/s41586019-1151-1
78. Miras HN, Mathis C, Xuan W, Long DL, Pow R, Cronin L. Spontaneous formation of autocatalytic sets with self-replicating inorganic metal oxide clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(20):10699-10705. doi:10.1073/pnas.1921536117
79. Bartlett S, Wong ML. Defining life in the universe: From three privileged functions to four pillars. *Life.* 2020;10(4):1-22. doi:10.3390/life10040042

80. Aydinoglu AU, Taşkın Z. Origins of Life Research: a Bibliometric Approach. *Orig Life Evol Biosph.* 2018;48(1):55-71. doi:10.1007/s11084-017-9543-4
81. Langton CG. *Artificial Life: An Overview.*; 1998. doi:10.2307/1575317
82. Forterre P, D'Hendecourt L, Malaterre C, Maurel MC. *De l'inerte Au Vivant. Une Enquête Scientifique et Philosophique.* (Huet S, ed.). Paris: la ville brûle; 2013.
83. Burnam-Fink M, Desch SJ, Scalice D, Davis H, Huff CJ, Apai D. Impact of the Arizona NExSS Winter School on Astrobiology Knowledge and Attitudes. *Astrobiology.* 2018;18(3):365-375. doi:10.1089/ast.2017.1710
84. Benner SA, Bains W, Seager S. Models and standards of proof in cross-disciplinary science: The case of arsenic DNA. *Astrobiology.* 2013;13(5):510-513. doi:10.1089/ast.2012.0954
85. Benner SA. Defining Life. *Astrobiology.* 2010;10(10):1021-1030. doi:10.1089/ast.2010.0524
86. Benner SA. *The Life, the Universe and the Scientific Method.* Gainesville: FfAME Press; 2009.
87. Helmreich S. *Sounding the Limits of Life : Essays in the Anthropology of Biology and Beyond.* Princeton University Press; 2015.
88. Houdart S. ANTHROPOLOGIE DES SCIENCES. Encyclopædia Universalis [en ligne].
89. Frazer JG. *Le Rameau d'or.* Bouquins. (Belmont N, Izard M, eds.). Paris: Robert Laffont; 1984.
90. Deliége R. *Une Histoire de l'anthropologie.* Paris: éditions du seuil; 2006.
91. Malinowski B. *Argonauts of the Western Pacific.* London: Routledge and Kegan Paul LTD; 1922.
92. Mauss M. Les techniques du corps. *J Psychol.* 1936;32. doi:10.1522/cla.mam.tec
93. Leroi-Gourhan A. *Milieu et Techniques.* Paris: Albin Michel; 1945.
94. Lévi-Strauss C. *La Pensée Sauvage.* Paris: Plon; 1962.
95. Descola P. Anthropologie de la nature. *Ann Hist Sci Soc.* 2002;57:9-25. doi:10.4000/books.cdf.1330
96. Pitrou P. La vie, un objet pour l'anthropologie ? *L'Homme.* 2014;4(212):159-189.
97. Pitrou P. Life as a Making. *NatureCulture.* 2017;4:1-37.
98. Fagundes GM. Fire normativities: Environmental conservation and quilombola forms of life in the brazilian savanna. *Vibrant Virtual Brazilian Anthropol.* 2019;16:1-22. doi:10.1590/1809-43412019v16d501
99. Povinelli E. *Geontologies.* Durham and London: Duke University Press; 2016.
100. Martin E. Anthropology and the Cultural Study of Science. *Sci Technol Hum Values.* 1998;23(1):24-44.

101. Latour B, Woolgar S. *Laboratory Life*. Princeton: Princeton University Press; 1979.
102. Williams, R. & Edge D. The social shaping of technology. *Res Policy*. 1996;25:856899.
103. Collins HM. The seven sexes: A study in the sociology of a phenomenon, or the replication of experiments in physics. *Sociology*. 1975;9(2):205-224. doi:10.1177/003803857500900202
104. Collins H, Pinch T. *The Golem*. Cambridge, Uk: Cambridge University Press; 1993.
105. Knorr-Cetina K. *Epistemic Cultures*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press; 1999.
106. Latour B. *Nous n'avons Jamais Été Modernes. Essai d'anthropologie Symétrique*. la Découverte.; 1997. doi:10.4000/books.septentrion.6765
107. Rabinow P. *French DNA*. London: The University Of Chicago Press; 1999.
108. Houdart S. *La Cour Des Miracles*. Paris: CNRS Editions; 2007.
109. Roosth S. *Synthetic : How Life Got Made ?* Chicago: The University Of Chicago Press; 2017.
110. Myers N. *Rendering Life Molecular*. Durham and London: Duke University Press; 2015.
111. Snow CP. Two cultures. *Science*. 1959;130(3373):419. doi:10.1126/science.130.3373.419
112. Eigenbrode SD, O'Rourke M, Wulfhorst JD, et al. Employing philosophical dialogue in collaborative science. *Bioscience*. 2007;57(1):55-64. doi:10.1641/B570109
113. Claus D. *Toward the Soul: An Inquiry into the Meaning of Ψυχή Before Plato*. New Haven: Yale University Press; 1981.
114. Houdart S, Thiery O. *Humains, Non Humains*. Paris: La découverte; 2011.

2. The Origin of Life: What is the Question?

The question of the origin of life (OoL) is a tenacious question that challenges many branches of science, but which is also extremely multifaceted. While prebiotic chemistry and micropaleontology reformulate the question as that of explaining the appearance of life on Earth in the deep past, systems chemistry and synthetic biology typically understand the question as that of demonstrating the synthesis of novel living matter from non-living matter independently of historical constraints. The objective of this contribution is to disentangle the different readings of the OoL question found in science. We identify three main dimensions along which the question can be differently constrained depending on context: historical adequacy, natural spontaneity, and similarity to life-as-we-know-it. We argue that the epistemic status of what needs to be explained — the explanandum — varies from approximately true when the OoL question is the most constrained to entirely speculative when the constraints are the most relaxed. This difference in epistemic status triggers a shift in the nature of the OoL question from an explanation-seeking question in the most constrained case to a fact-establishing question in the lesser constrained ones. We furthermore explore how answers to some interpretations of the OoL questions matter for other interpretations.

This chapter is adapted: from Malaterre, C., Jeancolas, C. and Nghe, P. “The origin of life: what is the question?” (Submitted to an interdisciplinary scientific journal).

2.1. Introduction

One most puzzling phenomenon that science is after is that of the origin of life. Although the scientific literature often refers to the “question of the origin of life”, this question can be understood in many ways. In some contexts, the question can be rephrased for instance, as:

“Where does the life we see on Earth come from?” or *“How actually did life appear on Earth?”* or still *“How is it the case that there presently is life on Earth?”*. But the question can also be quite differently construed. Some may argue that the proper question that lurks behind the “origin-of-life-question” is not a how-actually question but a how-possibly question such as: *“How possibly did life appear on Earth?”* or *“How plausibly did life appear on Earth?”*. Still for others, the scope of possibility may concern not just Earth and its history but is more general and ahistorical, leading to questions such as: *“How possibly might life-in-general appear from non-life anywhere in the universe?”*. Still, this can be understood in different ways, notably depending on whether human (or otherwise agential) interventions are permissible or whether the phenomenon to be explained — the explanandum — should be construed as a naturally occurring phenomenon. In the latter case, this can lead to questions such as *“How possibly might life in general spontaneously appear from non-life anywhere in the universe?”*, while the former view would lead to questions like: *“How possibly might life in general be made to appear from non-life anywhere in the universe?”*.

In turn, these different formulations of the origin of life (OoL) question lead to different types of approaches to the question. The diversity of these approaches is apparent in the literature and in the diversity of disciplines that contribute to the question. This is something that has already been described, for instance in ¹⁻⁴ where different scientific approaches to the question of understanding life and its origin were identified. Also, in ⁵, a three-tiered typology of “approaches to OoL science” has been proposed that include historical, synthetic and universal approaches, and which can be used to sort the different disciplines or fields that contribute to OoL science (prebiotic chemistry, synthetic biology, artificial life, etc.). To better characterize the different aims that scientists pursue in OoL science, Scharf et al. even proposed to distinguish seven “types of life” considered in OoL studies: terrestrial/actual, extraterrestrial, nonstandard composition, nonstandard structure, plausible, reinvented, in silico/abstract.

These works show that there is an acute need to disentangle the different OoL questions that are addressed in the field. Here we propose to do so by focusing not so much on the different types of approaches to the OoL question (and the scientific disciplines, fields or research programs behind these approaches) but on the very question itself. As such, our prime objective is not to sort out the types of research being conducted under the OoL umbrella, but to examine what motivates this research: the OoL question and the multiple ways in which it can be understood. In other words, we aim to explicate the different types of questions for which answers are sought. By so doing, we will show that the questions take different forms depending on their specific focus: whereas some of the OoL questions are clearly explanation-seeking questions (as in “explaining the origin of life on Earth”), others are actually better understood as fact-establishing questions (as in “synthesizing new life in the laboratory”). The reason is that the phenomena which are targeted by different formulations of the OoL question actually turn out to have different epistemic status: whereas some are well established (the origin of life on Earth)

others are presently still speculative and remain to be established (the possibility of synthesizing life in the laboratory).

To disentangle the different construals of the OoL question, we identify three sets of constraints that are imposed, sometimes explicitly but often implicitly, to the object of inquiry: a constraint of historical adequacy (typically, compatibility with current knowledge about the early Earth) ; a constraint of natural spontaneity (the transition from non-living matter to living matter should take place via naturally occurring or naturalizable processes), and a constraint of similarity with the only life form we currently know: that which is present on Earth (in other words, life-as-we-know-it as opposed to life-as-it-could-be). Taken together, these three sets of constraints define a conceptual space within which the different formulations of the OoL question can be positioned, depending on whether constraints are imposed or relaxed. While the different types of questions map onto the diversity of scientific approaches to the OoL question, and onto the different life-type targets one may choose (as pursued by different research teams and programs in a variety of scientific disciplinary fields), they also make salient other issues about the epistemic status of their object of inquiry, the nature of the question that is being asked, the relationships between different formulations of the OoL question (and possibly their respective answers) or about the possibility of relaxing constraints as a heuristic to tackle more tractable questions.

In what follows, we start by disentangling OoL questions along a historical/ahistorical dimension (Section 2): we examine the extent to which some OoL questions are deeply constrained by historical adequacy (thereby becoming questions of natural history) while other formulations are free from such constraints. We further disentangle OoL questions depending on whether permissible processes for the transition from non-living matter to living matter must all be naturally occurring processes or whether interventions are permissible (Section 3): while some ways of framing OoL questions allow for the researcher's intervention during the process (or, as a matter of fact, other types of interventions), other ways of addressing the OoL require that all processes be natural (or at least naturalizable) in the sense of being able to spontaneously occur without any intervention. Finally, we disentangle OoL questions depending on how constrained they are by properties of life-as-we-know-it, as opposed to being free of such constraints (Section 4). This leads us to consider a 3-dimensional conceptual space within which the different ways of understanding or formulating the OoL question can be positioned, depending on the extent to which these questions are narrowed down by the three sets of constraints (Section 5). We discuss the extent to which different types of OoL questions relate to explananda with different epistemic status depending on their position in this space. We map this change in epistemic status to a shift from explanation-seeking questions in the most constrained region of the space to fact-establishing questions in lesser constrained regions (Section 6). Finally (Section 7), we examine heuristic strategies that consist in shifting from one type of OoL question to another. In particular we investigate the extent to which relaxing (or adding) constraints goes hand-in-hand with what appears to be more (or less) tractable questions.

2.2. Origins-of-Life Questions and the Constraint of Historical Adequacy

A first way to disentangle OoL questions is to assess whether these questions are constrained by an objective of historical adequacy or not. Whereas some formulations of OoL questions are implicitly or explicitly set in a historical context — typically the context of the Earth of the deep past — other formulations voluntarily reject any such historical constraint and position themselves in an ahistorical context. As we will see below, when these historical constraints (among others) are relaxed, the OoL questions at stake bear on explananda that become more general, allow for multiple interpretations, and become increasingly speculative.

Framing the OoL question in a historical context is typically what happens when the explanatory ideal is that of explaining the origin of life as it actually unfolded on the primitive Earth some 4 billion years ago. In this case, the OoL question is constrained by historical facts, as presently best reconstructed by the historical sciences of the deep past, and in such a way that any putative answer to this question is required to be (at least) consistent with these facts. The historically constrained OoL question can be reformulated for instance as: *“How actually did life appear on Earth some 4 billion years ago?”*. More detailed constraints can be added. First, additional temporal or sequential constraints will impose specific timings for given events to take place as well as a sequential ordering of these events. For instance, temporal constraints will include a chronological marker at 3.42 Ga, the earliest time for which undisputed traces of living cells have been found,⁶ as well as a marker at 4.56 Ga, the time of the initial accretion of the Earth. As a result, any historically constrained OoL is bound to take place between these two markers. Second, constraints that concern specific events or past states-of-affairs can also be added. These include physico-chemical constraints in terms of possible constituents of primordial protoliving systems (e.g., types of prebiotically plausible chemical compounds, purity, concentration, stability etc.)⁷ as well as environmental constraints accounting for the conditions of the early Earth in which these chemical compounds and systems are hypothesized to have formed and evolved (e.g. atmospheric composition, temperature and acidity of the oceans, presence of wet-dry cycles, freeze-thaw cycles, volcanism and hydrothermal vents, high energy meteoritic shocks, serpentinization and metamorphic reactions etc.)^{8–10}

Despite significant uncertainties, these historical constraints can play a regulative ideal.¹¹

Traces of the Earth’s deep past have indeed been largely erased due to the high metamorphism that prevailed at that time and to the meteoritic late heavy bombardment (LHB) of some 3.8 Ga. As a result, the early history of the Earth is clouded in unknowns that concern not just the global environmental conditions of the early Earth but also the relevance of these global conditions compared to more varied and localized micro-environments (such as hydrothermal vents or serpentinization networks), and, as a consequence, the types of prebiotic compounds and systems that were present at the time.¹² Uncertainties also concern the chronological dating and the timeframe available for protoliving systems to appear. Some push the possibilities back into

the very first moments of the Earth when it started to harbour a crust and be habitable due to the presence of liquid water and a temporary reducing atmosphere some 4.3 Ga.⁹ Others see the 3.8 Ga meteoritic LHB as a reset factor.¹³ Depending on whether one considers putative traces of living systems to be present 3.8 Ga ago¹⁴ or whether one takes a more conservative marker at 3.4 Ga, the window for life's appearance may vary from maybe a few million years to nearly a billion. Finally, much uncertainty remains concerning the actual genealogy of early life forms. The earliest traces of life analyzed so far do not reveal the chemical composition of these fossilized living entities, hence no possible molecular-based comparison for instance with the Last Universal Common Ancestor (LUCA) that can be inferred from phylogenetic studies.^{15,16} This leaves wide open the genealogical path taken by actual life in its very early days. For all we know, it could be the case that these earlier traces are from extinct taxa and not relevant at all to the current three domains of life (Archaea, Bacteria and Eukarya). Despite all these uncertainties, some formulations of the OoL question clearly assume a context that is characterized by an objective of historical fidelity as best as afforded by the current status of science.

On the contrary, other formulations of the OoL question appear unbound by such historical constraints. This is for instance the case when no specific chronological constraints are imposed, allowing the transition from non-living matter to living matter to take place in any specific time frame — notably in shorter and experimentally accelerated temporal windows, so as to be amenable to experimental practice — or in any specific order. Relaxing historical constraints also means opening up the space of possibilities in terms of chemical compounds that can be mobilized beyond those that are prebiotically plausible. Environmental conditions too no longer need to be constrained by prebiotically plausibility. This leads to reformulating the OoL question for instance as: *“How might life appear on Earth?”*. Other similar nonhistorically constrained OoL questions include *“Could any form of life be synthesized?”* or *“What kind of environment would be favorable to the emergence of life?”*. As such, relaxing the historical constraints that applied to the appearance of life on Earth in the deep past turns the OoL question into a question that possibly encompasses the appearance of any extraterrestrial form of life as well, including one that would perfectly resemble life-as-we-know-it on Earth though its appearance might have taken a totally different historical path. Understood in such a way, the OoL question takes the form of *“How might alien-life appear on planet T?”*.

Note that relaxing the constraints on the OoL question changes its epistemic nature. Whereas the most constrained version of the question concerns an explanandum that we have good reasons to believe is true, lesser constrained versions still concern to date open possibilities or pure conjectures. Indeed, if the OoL question is asked with a view to explaining the actual origin of the life that is presently found on Earth, then the explanandum “there is life on Earth, and such life was already present on the early Earth some 4 billion years ago” is likely the closest to the truth one may formulate. Of course, even in this case there still remains some degree of uncertainty as it is possible that such early life be unrelated to current life as mentioned above (e.g., extinct taxa). Yet the phenomenon to be explained is a phenomenon that is considered as an established one. On the other hand, OoL questions without historical constraint open possibilities that are yet to be established: for instance, no one has yet synthesized novel life

forms in the lab from whichever chemical compounds. As the constraint is relaxed, the question shifts from explaining a known phenomenon (the origin of life of the primitive Earth) to establishing new phenomena (the possibility of bridging the gap between non-living matter and some form of living matter that is yet to be established).

2.3. Origins-of-Life Questions and the Constraint of Natural Spontaneity

A second way to disentangle OoL questions is to assess whether they refer to an ideal of explaining the OoL by appealing to naturally occurring processes only. When this explanatory ideal strongly constrains the OoL question, the appearance of life is construed as a phenomenon that should naturally occur by itself, without any intervention (by agential entities such as humans, machines or even any living being), hence somehow spontaneously. Let us call this constraint the constraint of “natural spontaneity”. Imposing this constraint results in framing the OoL question for instance as: “*Which natural processes best explain how living-matter spontaneously appears from non-living matter?*”. In this case, note that the question is totally agnostic with regards to historical constraints. It makes possible to appeal to any process that is known to naturally occur on Earth, is thought to have occurred on the primitive Earth, or is believed to occur anywhere else, notably on other planets of the solar systems or on exoplanets. What all these processes have in common is to spontaneously unfold, which is to say that they should take place without any agential intervention. By this we mean that interventions by humans, human-built machines, non-human living entities — including extra-terrestrial and supernatural entities — are not allowed to play any role in the causal chain from non-life to life.

Relaxing this constraint of “natural spontaneity” can be done in different ways and at different degrees. At one end of the spectrum, one would accept the use of artificial experimental set-ups purposely built to reproduce properties of naturally occurring configurations. Among them, we can cite efforts to model hydrothermal vents in laboratories¹⁷ or to make hot spring simulation chambers¹⁸. When the “natural spontaneity” constraint is relaxed, one may allow for artificial processes that do not actually mimic naturally occurring processes but that appear as reasonably transposable to natural environments. Let us call them “naturalizable processes”. Such processes include among others wet dry-cycles which are transposable to tide pools, as well as solution transfers which are transposable to stream connected pools¹⁹. At the other end of the spectrum, fully relaxing the “natural spontaneity” constraint allows for artificial processes that require highly sophisticated interventions. Among them, we can cite SELEX based in vitro evolution²⁰ or multistage microfluidics reactions.²¹

More precisely, one may think of relaxing the “natural spontaneity” constraint in two ways: either by mobilizing lesser “natural” processes or by allowing increased intervention (hence lesser “spontaneity”). Regarding the naturalness of processes, different degrees of relaxation

can be achieved. The simple fact that a prebiotic chemist puts the necessary reactants in finetuned concentrations, in pure water, and at a favorable temperature represents a way of slightly relaxing the natural spontaneity constraint. This relaxation can be interpreted as a way to accelerate what could otherwise be achieved in nature: it brings together different compounds in some conditions which could spontaneously occur given a sufficiently long waiting time. Moreover, the fine-tuned stable settings of the laboratory bypass the often-varying environmental conditions in nature. This results in yields that would be considered implausible in nature. Further relaxation may be achieved by artificially parallelizing a large number of reactions in order to increase an outcome probability. Such high throughput strategy is feasible via microfluidic droplet technology which enables the study of thousands of reactions at once²². The constraint can be further relaxed by allowing intricate complex set-up conditions while still letting things unfold by themselves. A typical example would be Miller's historical experiment:²³ the complex apparatus made with connected vessels and tungsten electrodes is highly artificial even if the purpose is to model naturally occurring events; once set up, however, the physico-chemical dynamics spontaneously happen. The complexity of the starting material also affects the natural spontaneity constraint. Indeed, the more complex the starting compounds are, the less likely they are to occur in nature.

Intervening at different stages of the processes is also a way of relaxing the natural spontaneity constraint: this allows for less spontaneous but more controlled processes. This is for instance the case with serial dilution experiments²⁴ or with multistage droplet microfluidics experiments²⁵ for which the involvement of the researcher and of complex pieces of equipment at different moments of the process are needed. Note that this is also implicitly the case when one implements experiments with sophisticated compounds such as oligo-DNAs which rely on machine and human interventions for their synthesis. Another case is exemplified by the merger of a machine-synthesized genome with a genome-free cell²⁶ which relaxes tremendously the natural spontaneity constraint: not only are numerous interventions required at different stages of the experiment, but input materials are also highly sophisticated up to the point of also mobilizing products from living organisms, notably a cell whose genome is removed. At the extreme, one could allow for the intervention of sexually reproducing organisms to bridge the gap from non-living entities (gametes, which cannot reproduce alone hence are not living according to some definitions of life such as the NASA one) to living entities (fertilized egg). Even more extreme cases of agential intervention would include non-terrestrial intervention. Indeed, this has been hypothesized in theories of panspermia,²⁷ or even directed panspermia where intelligent beings deliberately spread living entities.^{28,29} Still, some could insist on including supernatural or divine intervention on the spectrum, whether it is Young Earth creationism or Intelligent Design,³⁰ though this move would be incompatible with methodological naturalism and would shift the OoL question from science to religion, which is outside the scope of the paper.

Similarly to what we have seen in the case of the "historical adequacy" constraint, the explananda which are the most constrained in terms of "natural spontaneity" are also the most likely to be true. Indeed, the abiotic synthesis of complex organics, their abundance on meteorites, the presence of billion years old traces are all good reasons to believe that life did spontaneously appear through the unfolding of natural processes on the primitive Earth. In turn,

this explanandum makes requests for explanation legitimate. On the other hand, explananda that are lesser constrained in terms of natural spontaneity tend to be more speculative given the present status of scientific knowledge. Correspondingly, the questions take the form of factestablishing questions. Once facts are established, then (and only then) explanation-seeking questions can be properly formulated. The fact that agential explananda appear less likely to be true may be counter-intuitive. Given the extraordinary chemical complexity of the prebiotic Earth, one could think that it would be easier to make life from scratch in simpler and finetuned conditions in the laboratory. Yet, one may argue that such high complexity, which is perhaps unreachable to human agency, may actually be a necessary condition for the origin of life.³¹

2.4. Origins-of-Life Questions and the Constraint of Life-aswe-know-it

The third dimension that we propose for disentangling OoL questions is to assess whether the questions refer to the type of life that we find on Earth. This constraint of “similarity to life-aswe-know-it” plays a role in narrowing down the types of life whose origins are at stake. It characterizes the distance between the living systems whose origins are being investigated and the sorts of living systems we presently observe, independently of the constraints of “historical consistency” and “natural spontaneity”. A typical way to more precisely reformulate the OoL question in this context would be for instance as: “*Which processes best explain how life-aswe-know-it appears from non-living matter?*”. This constraint presupposes that life-as-weknow-it is well characterized in one way or another.

This can be done along four sets of characteristics. First, life-as-we-know-it can be characterized in terms of chemical composition. This chemical composition is well established and is based on organic chemistry, with water as solvent. The main molecular species found in living organisms are well-known and, though there are variations, include such compounds as nucleic acids, amino-acids, fatty acids, and carbohydrates — some of which only of a specific chirality — which assemble themselves respectively into RNAs, DNAs, proteins, lipids, and polysaccharides. Structurally speaking, these molecules are found within a bilayer lipidic membrane that delimits a cell, generally thought to be the fundamental unit of this life-as-weknow-it. Second, well-characterized biochemical processes usually occur in known life forms. These include electron transport chains, the citric acid cycle, the Calvin cycle and many other anabolic and catabolic pathways. Likewise, the processes that concern the transfer and copy of informational content between DNA, RNA and proteins are well established. At a higher scale, dynamic processes concern ecological networks and evolutionary patterns common to all known living species have been well investigated, even if a lot still remains to be done.³² Third, life-as-we-know-it can be characterized in terms of the environments where it can thrive. Despite the astonishing diversity of these environments, it is possible to point common

necessary factors that are the presence of electron donors (e.g. sulfide, organic matter), electron acceptors (e.g., dioxygen, nitrate, sulfate), sources of carbon (carbon dioxide or organic matter), sources of energy (light energy or chemical potential of some reduced chemical species) and sources of liquid water. The very last point imposes further restrictions on physical parameters of the environment such as temperature and pressure. Finally, life-as-we-know-it is characterized by some form of genealogical continuity, all extant organisms sharing a common LUCA (Last Universal Common Ancestor) as inferred by phylogenetic studies.^{15,16}

Relaxing the “similarity to life-as-we-know-it” constraint can be done along all four characteristics identified above. For instance, relaxing the constraint in terms of chemical composition turns the OoL question into that of the origin of hypothetical life forms such as those based on silicon instead of carbon.³³ Similarly, one may inquire into the possibility of entities with DNAs and RNAs made from 8 nucleotides rather than 4.³⁴ When one relaxes the constraint in terms of metabolism and dynamical processes, then the investigation of the origins of systems governed by other metabolisms for instance, or other evolutionary dynamics becomes acceptable as the focus of the OoL question. This could include the investigation of self-sustained artificial cells that would be devoid of reproduction capabilities.³⁵ Relaxing the constraint with respect to environmental characteristics makes it possible to target, among others, life forms under high pressure³⁶ or thriving in liquid methane oceans on the surface of Titan.³⁷ Finally, relaxing the constraint in terms of genealogical continuity opens up questions such as that of the origin of forms of life that would be somehow similar to life-as-we-know-it yet be the result of a different origin with no genealogical relationship to the life forms that now exist on Earth.

Note that the further one chooses to be from life-as-we-know-it, the further one may end up from something that most will accept as alive. Of course, all OoL questions presuppose some sort of agreement as to what one considers to be “life”, independently of which constraints are added to the question. The “similarity to life-as-we-know-it” constraint just makes this point more pressing since systems that are far from life-as-we-know-it might simply be far from life itself. Some may, for instance, consider stars³⁸, software³⁹ or machines⁴⁰ to be alive, and thereby propose to formulate corresponding OoL questions that would not be constrained by similarity to life-as-we-know-it. Others may target the emergence of intermediate life forms that could have preceded LUCA, like RNA-based protocells,^{41,42} or the synthesis of minimal cells whose genome would be extremely different from naturally occurring ones.⁴³ In these cases as well the question arises whether the entities whose emergence is at stake should still be considered alive despite being significantly different from life-as-we-know-it. Though our point in this paper is not to discuss definitions of life but simply to disentangle OoL questions as construed in the field, note that definitions of life that are gradual and that rely on exemplars of life-as-we-know-it as a benchmark for truly-alive entities could bring a solution to this issue.^{11,44,45} This is all the more so when methods are proposed to assess the relative distance—or lifeness—of given entities to specific exemplars of life-as-we-know-it.⁴⁶

In any case, explananda which are the most constrained by “similarity to life-as-we-know-it” are the most likely to be true. Actual life is something we are familiar with, that can be observed and investigated over and over again, even in the absence of a paradigmatic definition.

Therefore, explaining the origin of life-as-we-know-it is explaining the origin of a known fact. On the other hand, lesser constrained explananda are more speculative. For instance, a siliconbased form of life has been hypothesized³³ but never observed in nature nor in the laboratory.

In that case, explaining the origin of silicon-based life appears like putting the horses before the cart: one first needs empirical grounds in favour of the existence of such silicon-based life before asking the question as to how such life form appeared.

2.5. The Dimensions of Origins-of-Life Questions

The three types of constraints we identified above — historical adequacy, natural spontaneity and similarity with life-as-we-know-it — map different dimensions along which to disentangle the diversity of OoL questions. When taken together, they form a multidimensional conceptual space that makes it possible to dissociate significantly different ways of specifying OoL questions, from a strongly constrained version in one corner to a much lesser constrained version at the other extreme, and a range of options in between. For the sake of simplicity, we will assume that constraints can be either high or low (see Fig. 1). When all three constraints are high (region A1 on Fig. 1), the OoL question then presupposes that the type of life whose origin is being investigated is nothing different from the type of life that planet Earth harbours, that it is the history of this origin that is being sought after as it actually unfolded in the deep past, and that this origin is taken to be the result of naturally occurring spontaneous processes. This OoL question can be made more explicit under the form: “*How did life-as-we-know-it spontaneously appear from non-living matter on prebiotic Earth?*”. Typical research programs that address this version of the OoL question are found in the fields of prebiotic chemistry, micropaleontology, or planetology to name a few.^{e.g., 47–49} Top-down approaches that investigate the phylogenetic roots of life or search for minimal genomes also contribute to this same question.^{16, 50}

On the other hand, constraints can be fully relaxed along all three dimensions (region D2 on Fig. 1). In such a case, the OoL question becomes one of investigating the transition from nonliving matter to living matter independently of any historical prebiotic plausibility nor any compliance with life-as-we-know-it, and without any constraint about naturally occurring processes. The OoL question is then better understood as something like: “*How can one bring about any life-like entity given no constraints of any kind?*”. This is the type of question that sets the agenda of research programs in such fields as synthetic biology, systems chemistry or Alife.^{51–53}

In between these two extremes, any combination of low/high constraints is possible. For instance, one may construe the OoL question with low historical constraints, high natural spontaneity constraints and low constraints with regards to similarity to life-as-we-know-it

(region B2 on Fig. 1). In such a case, the OoL question takes the form of: “*How can life (in general) spontaneously appear from non-living matter given no historical/prebiotic constraints?*”. Along the same lines of inquiry, one finds questions such as: “*Which chemistries make possible the appearance of life (in general)?*”, but also existence questions such as: “*Are there other forms of life (than life-as-we-know-it) that have spontaneously appeared somewhere in the universe?*”, or complementary questions such as: “*What is the probability of life in the Universe?*”. In all these cases, constraints in terms of historical adequacy and similarity to life-as-we-know-it are low while the constraint of natural spontaneity is high. Research programs that more specifically address this formulation of the OoL question include programs in astrobiology that aim at finding new forms of life outside of the Earth, or in universal biology.^{e.g., 54,55} A quite different way to construe the OoL question is to have low historical and natural spontaneity constraints while still requiring strong similarity to life-as-we-know-it (region D1 on Fig 1.). In that case the question can be understood along the lines of: “*How might such and such experimental settings (which require much intervention from the researcher) make it possible for life-as-we-know-it to appear given no requirement for prebiotic plausibility?*”. Research programs that mobilize compounds or systems similar to those of present life forms to try and synthesize living entities in the laboratory typically address this formulation of the OoL question. They are found in fields such as synthetic biology.^{e.g., 26,56} Different combinations of these constraints also help make sense of conceptual distinctions that have been made between “protocell” (historical adequacy constraint), “minimal cell” (similarity with life-as-we-know-it) and “artificial cell” (no constraints)⁵⁷. As can be seen on Fig. 1, four other combinations of constraints lead to four other types of formulations of the OoL question.

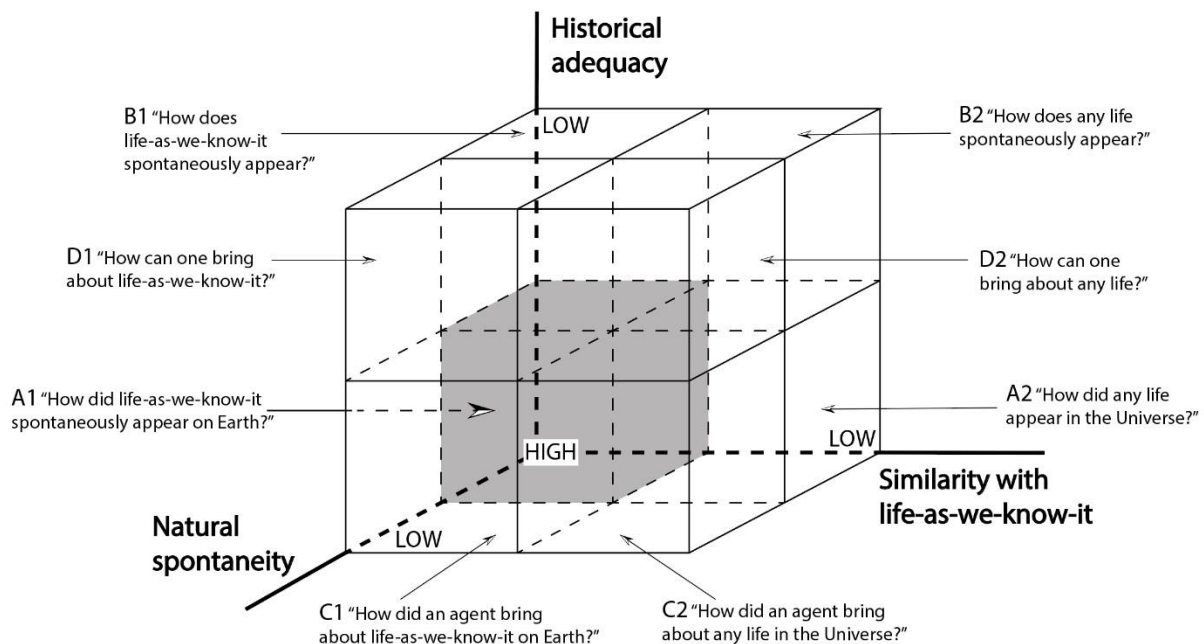


Figure. 1. The conceptual space of origin-of-life questions. Each axis corresponds to one of the three constraints identified above: historical adequacy, natural spontaneity, and similarity to life-as-we-know-it. Combinations of low and high values along these axes define 8 regions that

lead to specific formulations of the OoL question. **A1.** In this region, OoL questions refer to the most likely true explanandum, that is the historical spontaneous origin of life-as-we-know-it. Fields such as prebiotic chemistry are specifically concerned. **A2.** This region relies on the assumption that there is at least one other life form whose origin is to be explained. A prerequisite question is a fact-establishing one: “Is (was) there such life elsewhere?”. Relevant research programs are found in the field of astrobiology field and also include the “shadow biosphere” hypothesis.⁵⁸ **B1.** OoL questions in region B1 rely on the assumption that life-as-we-know-it may emerge independently of any historical context. This region includes for instance the search of other (genealogically distinct) instances of life-as-we-know-it as well as what was called “spontaneous generation before robust phylogenetic studies pointed toward a common origin for all known living organisms.”⁵⁹ **B2.** Like for A2, OoL questions in this region also rely on the (yet-to-be-established) fact that there other life-forms are possible, but the questions are free of any historical constraint. Xenobiology and orthogonal biology are disciplines that can play a role in elucidating this type of questions.^{34,60} **C1.** In this region, OoL questions rely on the fact that life-as-we-know-it is results from an agent. This explanandum is often regarded as very unlikely in a scientific approach, though hypotheses include directed panspermia²⁹. **C2.** Unlike C1, this region includes OoL questions not about life-as-we-knowit but about any life-form that is thought to result from an agent. However, like in A2, it remains to be showed that such other life-forms actually exist. This is where astrobiology is concerned. **D1.** In this region, OoL questions concern the synthesis of life-as-we-know-it by any agent, including humans. Again, this relies on the assumption that this is achievable. Synthetic biology is typically the discipline interested in such endeavor. **D2.** OoL questions in this region are the least constrained. The explanation of the artificial production of any life form given no historical constraint fits here.

Altogether, the three types of constraints reveal different types of research questions that lie under the broader “OoL question”. These research questions result from specifying different degrees of constraints in terms of historical adequacy, natural spontaneity, and similarity to life-as-we-know-it. The conceptual space within which the different questions can be positioned not only makes room for all the different formulations of the OoL question found in the literature⁵ but also helps to make sense of the diversity of scientific research programs that target OoL questions. As a result, it provides insights as to why some researchers may claim to address the OoL question while appearing not to do so for others. The OoL question is indeed a contextual question that receives more precise formulations depending on the set of constraints that are included (or accepted) within different research programs.

Some may, for instance, frame the OoL question as mainly explaining the appearance of the first self-replicating ribozyme (RNA-world hypothesis).^{e.g., 61,62} In this context, the OoL question becomes: “*How did the first self-replicating ribozyme appear on the primitive Earth?*”. Such a question is constrained along the dimensions of historical adequacy and natural spontaneity, yet much less constrained along the dimension of similarity to life-as-we-know-it, since it can (quite understandably) be argued that self-replicating ribozymes are still quite a

stretch to life-as-we-know-it (though simple ribozymes are quite common within extant organisms). As mentioned earlier, some research in synthetic biology dwells on genome engineering²⁶. In this context, some may argue that adding a genome to a genome-deprived cell makes the cell transition from a non-living state to a living state, hence an affirmative answer to the question: “*Is it possible to synthesize life in the laboratory?*”, or more specifically “*How might such and such experimental settings (which require much intervention from the researcher) make it possible for life-as-we-know-it to appear given no requirement for prebiotic plausibility?*”. In such a case, the question is highly constrained by life-as-we-know-it (it bears on existing cellular organisms); on the other hand, there is no requirement for any historical adequacy (i.e., no prebiotic plausibility constraint) or for natural spontaneity (the experiments rely on numerous interventions).

Different research programs thereby target quite different interpretations of the OoL question despite all claiming to shed light on that very question. Depending on how one specifies one’s research question in terms of the three constraint-dimensions we have highlighted, that question may appear as more or less appropriate for different audiences which, in turn, value each question differently. As a result, it is no surprise that claims about answering the OoL question raise much controversy: these claims are often different claims about answering different questions, often motivated by specific disciplinary anchorages within a broad range of fields all by and large interested in OoL research. The conceptual space of Figure 1 not only accounts for the diversity of interpretations of the OoL question but also, and maybe more importantly, highlights how these questions relate to one another in a systematic way. The questions are not just different questions on their own: they are variations of one another when specific constraints are imposed or relaxed. In other words, one may shift from one question to another by varying the degree of constraints along one or several dimensions at once.

2.6. From Explanation-seeking Questions to Fact-establishing Questions

Clarifying the different ways in which the OoL question can be interpreted makes explicit the fact that in many cases the phenomena that form the target of the question have not yet been established. A consequence is that, despite all appearances, the OoL question rarely is an explanation-seeking question of the form “Why *P*?” or “How is it the case that *P*?” with *P* a true proposition depicting an actual phenomenon. This is something that we noted above when we discussed each type of constraints and that we can now assess more systematically when considering the three types of constraints together. Indeed, only in the most constrained case is the OoL question an explanation-seeking question: when all constraints of historical adequacy, natural spontaneity and similarity with life-as-we-know-it are applied, the OoL question bears upon explaining the historical origin of life-as-we-know-it on Earth: “*How did life-as-we know it*

spontaneously appear from non-living matter on the prebiotic Earth?”. This can be reformulated as “*Why P?*” or “*How is it the case that P?*” with P the proposition “*Life-as-we know-it spontaneously appeared from non-living matter on the prebiotic Earth*”. As far as we can tell, and even if the constraints are still loosely defined, P is true. As a result, one can justifiably request an explanation of the phenomenon described by P. Of course, we might err by considering P as true since, for all we know, currently available evidence is still compatible with other hypotheses such as directed panspermia or the emergence of life-as-we-know-it during a later second origin among the remains of a more primordial life different from life-as-we-know-it. Yet, at present, P is largely considered as true within the broader scientific community.

On the other hand, whenever any of the three constraints are relaxed, the question shifts from a “*How is it the case that P?*” to a “*Is it the case that P?*”. Consider, for instance, the case of (B2) “*How does life (in general) spontaneously appear from non-living matter given no historical/prebiotic constraints?*” for which only the natural spontaneity constraint is high, while the historical adequacy and similarity to life-as-we-know-it constraints are low. For reformulating the question as an explanation-seeking question we would need to formulate P as “*Life (in general) spontaneously appears from non-living matter given no historical/prebiotic constraints*”. Yet we would be hard pressed to accept P as true. Indeed, as it currently stands in science, we have no clue whether P is true since this has never been established: no one has ever observed the spontaneous formation of living matter from nonliving matter in the laboratory. Similarly, no one has yet identified a form of extraterrestrial sign of life (extant or past). In such circumstances, it appears more adequate to say that the proper question is not an explanation-seeking question but a fact-establishing question: “*Is it the case that P?*”. Of course, once P is established, the question will immediately turn into an explanation-seeking question. But our point is that this is not (yet) presently the case. Given the current status of science, this situation concerns all regions of the multidimensional conceptual space of Figure 1 except the most constrained one.

In all these regions, the epistemic status of the explananda remains highly speculative as we speak, whereas the epistemic status of the explanandum of the most constrained region is considered as true (or closest to true we can formulate). What needs to be done first is to establish the truth of the explananda by establishing the existence of the phenomena (for instance, establish the existence of (traces of) life on other planets or exoplanets or establish the possibility of creating life in the laboratory). This amounts to establishing new instances of origin of life. Searching for an explanation of these explananda will only be possible once the explananda have been established. Of course, one may argue that, in some cases, searching for an explanation of a speculative explanandum could be done at the same time as searching for the existence of that explanandum. This is indeed plausible: for instance, when engineering a synthetic cell, one may assume that one would be able to put forward reasons for explaining the life-like behaviour of these synthetic cells. On the other hand, explaining how some forms of life came to be on another planet can only be a proper target for an explanation-seeking question once the existence of life on that planet has been established, which is to say: once the factestablishing question has been positively answered. Of course, establishing the phenomenon and its explanation is also likely to produce other spin-off questions (for instance: *How robust*

is the phenomenon depending on a range of conditions? How different is this life form from life-as-we-know-it? How related?). Yet note that these questions, which are also found in the OoL literature, bear on phenomena that still remain speculative to date. Fact-establishing questions need to be answered first.

2.7. Epistemic Trajectories and Interdependence of Origins-of-Life Questions

Although research in the OoL field generally refers to *the question of the origin of life* without further specification, actual approaches cover the variety of nuances presented above. Researchers are indeed led to relax constraints for reasons imposed by their usual practice of science. As we have seen, the relaxation of constraints is associated with addressing more speculative explananda. Establishing or observing such explananda (e.g., forms of life that differ from life-as-we-know-it) then becomes an integral part of the question. But are we only facing limitations here? Relaxing constraints has an epistemic cost yet, by the same token, it enables technically more tractable approaches that are more likely to yield an explanans. We argue below that, beyond the value that a given community may grant to particular findings, addressing relaxed OoL questions seems almost necessary to construct a path to addressing the most constrained question.

The fact that researchers typically address relaxed versions of the OoL question may be best explained by their practice of science. Indeed, technical tractability imposes experimental or theoretical choices and research communities seek avenues that are the most productive given these choices. In the extreme case, opportunities to contribute to the OoL question arise from discoveries or technologies with completely different purposes. Examples are numerous: every improvement of analytical tools invites a reanalysis of Miller-like experiments;⁶³ the appearance of computer science led to the field of artificial life;⁶⁴ synthesis of liposomes for drug delivery brings in possibilities to build protocells;⁶⁵ droplet microfluidics for highthroughput screening enables compartmentalized life-cycles of chemical reaction networks;²¹ CRISPR based gene editing opens the possibility to experimentally investigate minimal genomes;⁴³ the discovery of functional roles for liquid-liquid phase separations in cells revives coacervate theories;⁶⁶ and so forth. The framing of the OoL question may also reflect intricate combinations of technical and sociological factors. For instance, producing pure enantiomers is entrenched in the practice of chemistry, primarily for pharmaceutical motivations, but the study of chirality has considerable momentum in prebiotic chemistry.⁶⁷ There is indeed strong institutional support, established methodologies, and a well identified impact in the community for studying chirality in its own right, somehow removing some of the burden imposed by the most constrained OoL question. Another important example is the detection of exoplanets, enabled by a dramatic improvement in observation and analysis capabilities. The discovery of exoplanets has a strong impact in astrophysics independently of the OoL

question.⁶⁸ However, the question of life elsewhere (relaxing the historical adequacy constraint) is seen as a central motivation in research programs for exoplanets, leading to focused notions such as “Earth-like planets” and “habitable zones”.⁶⁹

In any case, epistemic reasons that lead to constraint relaxation also lead to questions that tend to be more amenable to experimental or theoretical investigation. Relaxing the constraint of “historical adequacy” allows one to reach experimentally feasible timeframes. The experimental inaccessibility of geological time scales can be overcome by recreating environmental conditions and isolating particular events. Even in the case of temperature variations across day and night, driving an experimental system in an accelerated manner provides access to the outcome of many repeated cycles. Relaxing historical adequacy constraint also allows one to consider a variety of candidate chemistries, a mere necessity given the poor knowledge of prebiotic chemical environments. Overall, the historical timeline is reconstructed only in theory, based on experimental data corroborated with geological records. With respect to the constraint of “similarity to life-as-we-know-it”, one may consider attempts to build protocells in a bottom-up manner. This task reveals to be highly challenging from the physical-chemical viewpoint and has not been achieved yet. At this stage, it seems necessary to use compounds, arrangements and conditions that do not reflect life-as-we-know-it but would maximize the chances for experimental success (e.g., alternative biopolymers or activated building blocks to achieve template-based replication). Relaxing the “similarity to life-as-we-know-it” constraint is also unavoidable when searching for signs of extraterrestrial life in the solar system or on exoplanets. On the other hand, relaxing the “natural spontaneity” constraint is constitutive to experimental approaches, where spontaneity can only be allowed within certain limits. Chemistry proceeds from purified compounds, in which case agents intervene beforehand. These compounds, together with clean laboratory procedures, are necessary for the sake of experimental design, analysis, and reproducibility. In directed evolution, the mechanisms of Darwinian evolution are executed through instruments and purified enzymes and building blocks. Such interventions yield molecules with specific properties (e.g., catalytic RNAs known as ribozymes and obtained by SELEX) that are rare thus extremely unlikely to be found by chance. Nevertheless, showing the existence of these molecules is central to our ability to study RNA-world scenarios, among others. Furthermore, computer-based artificial life gets rid of all the constraints mentioned above, but this research still represents a powerful tool to investigate at large the principles governing the OoL.

Though relaxing constraints imposed onto the OoL question leads to research questions with increased tractability, specific works may be seen as narrowing down too much the space of possibilities, or as driving us away from answers to the more constrained questions. For instance, whether computer simulations have any chance to produce any form of life is debated.⁷⁰ It is thus crucial to analyze the epistemic interdependence between different readings of the OoL question, notably to investigate how less constrained questions may shed light or not onto more constrained ones.

A first virtue of less constrained questions is that demonstrations of impossibility should apply to more constrained versions of the question. Showing that certain polymerization processes fail over an extended phase diagram of physical-chemical conditions (temperature, pH, salinity,

...) discards such processes from any particular scenario. Impossibilities can be demonstrated theoretically, by showing that dynamical regimes are incompatible. For example, due to the error threshold of Eigen, sustained template-based polymerization catalyzed by a replicase is incompatible with the presence of RNAs shorter than the replicase in the absence of compartment level selection⁷¹. The case of the replicase points to the other side of the problem, which is to demonstrate the feasibility of certain states or regimes. Once theory has defined a threshold (a set of minimally required parameter values) for sustained replication, synthesizing a replicase ribozyme (a catalytic RNA) compatible with the threshold would be a central milestone for RNA world scenarios. However, replicase ribozymes are not found in extant life, have no historical record, and are unlikely to appear spontaneously. This highlights how studies based on relaxed questions allow one to isolate intermediate steps within a range of possible scenarios, then either reject or provide a proof-of-concept for the existence of certain states of matter.⁴

A second virtue of relaxed OoL questions is their heuristic value to guide processes of generalization and refinement. Simply put, once a less-constrained question has been answered, one can add constraints back and address a more-constrained question with the insights gained from the lesser constrained one. This reveals to be particularly useful when dealing with emergent phenomena that result from collective self-organization, where the interactions of many components with many degrees of freedom lead to a combinatorial explosion of possibilities. Sequence-function relationships in peptides or RNAs as well as evolutionary dynamics in chemical reaction networks fall in this category.^{20,22,72,73} The typical approach to studying these systems is to consider that what is true for a certain system must be true for a large category of systems. To exemplify this, knowing how widespread RNAs or oligopeptides of a given catalytic activity are (within the “neutral space”) gives information about the probability of emergence of self-reproduction and the evolvability of molecules. Predicting sequence activity is currently infeasible computationally. In practice, the characterization of the neutral space is achieved by combining computational studies on toy-models, measuring statistical distributions in experimental models (e.g., artificial selection of sequences that bind to a particular molecule), and confronting them with theoretical expectations for the shape of these distributions.^{74,75} The assumption here is that, although the particular measurements and models are irrelevant to the most constrained OoL questions, they nevertheless represent knowledge that can be generalized and applied to the latter. The specific application of the results to OoL scenarios can be seen as a process of naturalization, where sequences are selected based on the three types of constraints: the sequences should be active in physical-chemical conditions corresponding to geological records (constraint of historical adequacy); they should have a higher probability to appear spontaneously, notably by being among the shortest (constraint of natural spontaneity); and they should be connected through a stepwise evolutionary path to molecules observed in extant life (constraint of similarity to life-as-we-know-it).

So, in contrast with the idea that imposing constraints from history or life-as-we-know-it helps to select situations which have the most chances to succeed, it appears that relaxed OoL questions can indeed provide strategies to gain information and make progress toward defining plausible OoL scenarios even in their most constrained formulations.

2.8. Conclusion

The OoL question misleadingly subsumes several research questions depending on how the question is understood. By considering three sets of constraints — “historical adequacy”, “natural spontaneity”, “similarity to life-as-we-know-it” — we have shown that the question can be construed in strikingly different ways depending on its position within the conceptual space that the three sets of constraints define. Most importantly, the nature of the question actually changes depending on how constrained one considers the question to be. While the OoL question is an explanation-seeking question in its most constrained version, it becomes a fact-establishing question as soon as constraints are relaxed. The reason is that the explanandum which is at the core of the OoL question is (most likely) true in its most constrained version, whereas it typically becomes speculative in its lesser constrained versions. Changes in the epistemic status of the explanandum imply changes in the nature of the question that is actually tackled in the field. As a consequence, so far, there is only one proper explanation-seeking question about the origin of life, while there are several fact-establishing questions which, once answered — and only then — will lead to other explanation-seeking questions. We also argued that the epistemic trajectories of research questions within the conceptual space defined by the three sets of constraints is, most notably, affected by considerations about the tractability of research questions, such tractability most likely increasing while constraints on the question are relaxed. Disentangling the different construals of the OoL question matters since what may be considered by some to be a proper answer to the question may be considered by others not to answer the question at all. The reason is not only that each one may be pursuing a different question, but also that the very nature of the question changes depending on how constrained one considers the question to be. However, studies that address less constrained but more tractable questions constructively contribute to the more constrained questions, whether they establish intermediate steps, provide means of generalization or indicate paths for naturalizing synthetic processes.

References

1. Morange M. *La Vie Expliquée ? : 50 Ans Après La Double Hélice*. Odile Jacob.; 2010.
2. Malaterre C. *Les Origines de La Vie: Émergence Ou Explication Réductive*. Hermann; 2010.

3. Mann S. The Origins of Life: Old Problems, New Chemistries. *Angew Chem Int Ed.* 2013;52(1):155-162. doi:10.1002/anie.201204968
4. Jeancolas C, Malaterre C, Nghe P. Thresholds in Origin of Life Scenarios. *iScience.* 2020;23(11):101756. doi:10.1016/j.isci.2020.101756
5. Scharf C, Virgo N, Cleaves HJ, et al. A Strategy for Origins of Life Research. *Astrobiology.* 2015;15(12):1031-1042. doi:10.1089/ast.2015.1113
6. Javaux EJ. Challenges in evidencing the earliest traces of life. *Nature.* 2019;572(7770):451-460. doi:10.1038/s41586-019-1436-4
7. Kitadai N, Maruyama S. Origins of building blocks of life: A review. *Geoscience Frontiers.* 2018;9(4):1117-1153. doi:10.1016/j.gsf.2017.07.007
8. Kasting J. Methane and climate during the Precambrian era. *Precambrian Research.* 2005;137(3-4):119-129. doi:10.1016/j.precamres.2005.03.002
9. Benner SA, Bell EA, Biondi E, et al. When Did Life Likely Emerge on Earth in an RNA-First Process? *ChemSystemsChem.* 2020;2(2). doi:10.1002/syst.201900035
10. Damer B, Deamer D. The Hot Spring Hypothesis for an Origin of Life. *Astrobiology.* 2020;20(4):429-452. doi:10.1089/ast.2019.2045
11. Sutherland JD. Opinion: Studies on the origin of life — the end of the beginning. *Nat Rev Chem.* 2017;1(2):0012. doi:10.1038/s41570-016-0012
12. Stüeken EE, Anderson RE, Bowman JS, et al. Did life originate from a global chemical reactor? *Geobiology.* 2013;11(2):101-126. doi:10.1111/gbi.12025
13. Sutherland JD. The Origin of Life-Out of the Blue. *Angew Chem Int Ed.* 2016;55(1):104-121. doi:10.1002/anie.201506585
14. Schopf JW. Fossil evidence of Archaean life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2006;361(1470):869-885. doi:10.1098/rstb.2006.1834
15. Koonin EV. Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor. *Nature Reviews Microbiology.* 2003;1(2):127-136. doi:10.1038/nrmicro751
16. Weiss MC, Sousa FL, Mrnjavac N, et al. The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nat Microbiol.* 2016;1(9):16116. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.116
17. Kawamura K. Hydrothermal Microflow Technology as a Research Tool for Origin-of-Life Studies in Extreme Earth Environments. *Life.* 2017;7(4):37. doi:10.3390/life7040037
18. Gangidine A, Havig JR, Hannon JS, Czaja AD. Silica Precipitation in a Wet–Dry Cycling Hot Spring Simulation Chamber. *Life.* 2020;10(1):3. doi:10.3390/life10010003

19. Becker S, Schneider C, Okamura H, et al. Wet-dry cycles enable the parallel origin of canonical and non-canonical nucleosides by continuous synthesis. *Nat Commun.* 2018;9(1):163. doi:10.1038/s41467-017-02639-1
20. Pressman AD, Liu Z, Janzen E, et al. Mapping a Systematic Ribozyme Fitness Landscape Reveals a Frustrated Evolutionary Network for Self-Aminoacylating RNA. *J Am Chem Soc.* 2019;141(15):6213-6223. doi:10.1021/jacs.8b13298
21. Matsumura S, Kun Á, Ryckelynck M, et al. Transient compartmentalization of RNA replicators prevents extinction due to parasites. *Science.* 2016;354(6317):1293-1296. doi:10.1126/science.aag1582
22. Ameta S, Arsène S, Foulon S, et al. Darwinian properties and their trade-offs in autocatalytic RNA reaction networks. *Nat Commun.* 2021;12(1):842. doi:10.1038/s41467-021-21000-1
23. Miller SL. A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science.* 1953;117(3046):528-529.
24. Vincent L, Berg M, Krismer M, et al. Chemical Ecosystem Selection on Mineral Surfaces Reveals Long-Term Dynamics Consistent with the Spontaneous Emergence of Mutual Catalysis. *Life.* 2019;9(4):80. doi:10.3390/life9040080
25. Lu H, Blokhuis A, Turk-MacLeod R, et al. Emergent fitness and ecological dynamics of compartmentalised autocatalytic chemical reactions. *Not published.* Published online 2021.
26. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. *Science.* 2010;329(5987):52-56. doi:10.1126/science.1190719
27. Sadlok G. On A Hypothetical Mechanism of Interstellar Life Transfer Trough Nomadic Objects. *Orig Life Evol Biosph.* 2020;50(1):87-96. doi:10.1007/s11084-020-09591-z
28. Crick F. *Life Itself: Its Origin and Nature.* 1st edition. Touchstone, Simon & Schuster; 1982.
29. Sleator RD, Smith N. Directed Panspermia: A 21st Century Perspective. *Science Progress.* 2017;100(2):187-193. doi:10.3184/003685017X14901006155062
30. Pennock RT. Creationism and Intelligent Design. *Annu Rev Genom Hum Genet.* 2003;4(1):143-163. doi:10.1146/annurev.genom.4.070802.110400
31. Islam S, Powner MW. Prebiotic Systems Chemistry: Complexity Overcoming Clutter. *Chem.* 2017;2(4):470-501. doi:10.1016/j.chempr.2017.03.001
32. Noble D. Evolution beyond neo-Darwinism: a new conceptual framework. *Journal of Experimental Biology.* 2015;218(8):1273-1273. doi:10.1242/jeb.123125

33. Bains W. Many Chemistries Could Be Used to Build Living Systems. *Astrobiology*. 2004;4(2):137-167. doi:10.1089/153110704323175124
34. Hoshika S, Leal NA, Kim M-J, et al. Hachimoji DNA and RNA: A genetic system with eight building blocks. *Science*. 2019;363(6429):884-887. doi:10.1126/science.aat0971
35. Beneyton T, Krafft D, Bednarz C, et al. Out-of-equilibrium microcompartments for the bottom-up integration of metabolic functions. *Nat Commun*. 2018;9(1):2391. doi:10.1038/s41467-018-04825-1
36. Tobé S, Heams T, Vergne J, Hervé G, Maurel M-C. The catalytic mechanism of hairpin ribozyme studied by hydrostatic pressure. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(8):2557-2564. doi:10.1093/nar/gki552
37. McKay CP, Smith HD. Possibilities for methanogenic life in liquid methane on the surface of Titan. *Icarus*. 2005;178(1):274-276. doi:10.1016/j.icarus.2005.05.018
38. Lineweaver CH. We have not detected extraterrestrial life, or have we? In: Seckbach J, ed. *Life as We Know It*. Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology. Springer; 2006:445-457.
39. Turney PD. Evolution of Autopoiesis and Multicellularity in the Game of Life. *Artificial Life*. 2021;27(1):26-43. doi:10.1162/artl_a_00334
40. Zykov V, Mytilinaios E, Adams B, Lipson H. Self-reproducing machines. *Nature*. 2005;435(7039):163-164. doi:10.1038/435163a
41. Joyce GF, Szostak JW. Protocells and RNA Self-Replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(9):a034801. doi:10.1101/cshperspect.a034801
42. Toparlak OD, Mansy SS. Progress in synthesizing protocells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019;244(4):304-313. doi:10.1177/1535370218816657
43. Pelletier JF, Sun L, Wise KS, et al. Genetic requirements for cell division in a genomically minimal cell. *Cell*. 2021;184(9):2430-2440.e16. doi:10.1016/j.cell.2021.03.008
44. Bruylants G, Bartik K, Reisse J. Is it Useful to Have a Clear-cut Definition of Life? On the Use of Fuzzy Logic in Prebiotic Chemistry. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. 2010;40(2):137-143. doi:10.1007/s11084-010-9192-3
45. Malaterre C. Liveness signatures and the roots of the tree of life. *Biology & Philosophy*. 2010;25(4):643-658. doi:https://doi.org/10.1007/s10539-010-9220-8
46. Malaterre C, Chartier J-F. Beyond categorical definitions of life: a data-driven approach to assessing liveness. *Synthese*. Published online August 19, 2019. doi:10.1007/s11229019-02356-w
47. Maruyama S, Ikoma M, Genda H, Hirose K, Yokoyama T, Santosh M. The naked planet Earth: Most essential pre-requisite for the origin and evolution of life. *Geoscience*

48. Patel BH, Percivalle C, Ritson DJ, Duffy CD, Sutherland JD. Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nature Chem*. 2015;7(4):301-307. doi:10.1038/nchem.2202
49. Pearce BKD, Tupper AS, Pudritz RE, Higgs PG. Constraining the Time Interval for the Origin of Life on Earth. *Astrobiology*. 2018;18(3):343-364. doi:10.1089/ast.2017.1674
50. Ouzounis CA, Kunin V, Darzentas N, Goldovsky L. A minimal estimate for the gene content of the last universal common ancestor—exobiology from a terrestrial perspective. *Research in Microbiology*. 2006;157(1):57-68. doi:10.1016/j.resmic.2005.06.015
51. Cronin L, Walker SI. Beyond prebiotic chemistry. *Science*. 2016;352(6290):1174-1175. doi:10.1126/science.aaf6310
52. Glade N, Bastien O, Ballet P. Diversity and survival of artificial lifeforms under sedimentation and random motion. *Theory Biosci*. 2017;136(3-4):153-167. doi:10.1007/s12064-017-0254-1
53. Lutz J. Can Life Emerge from Synthetic Polymers? *Isr J Chem*. 2020;60(1-2):151-159. doi:10.1002/ijch.201900110
54. Deamer D, Damer B. Can Life Begin on Enceladus? A Perspective from Hydrothermal Chemistry. *Astrobiology*. 2017;17(9):834-839. doi:10.1089/ast.2016.1610
55. Bartlett S, Wong ML. Defining Lyfe in the Universe: From Three Privileged Functions to Four Pillars. *Life*. 2020;10(4):42. doi:10.3390/life10040042
56. Stanó P. Is Research on “Synthetic Cells” Moving to the Next Level? *Life*. 2018;9(1):3. doi:10.3390/life9010003
57. Caschera F, Noireaux V. Integration of biological parts toward the synthesis of a minimal cell. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2014;22:85-91. doi:10.1016/j.cbpa.2014.09.028
58. Davies PCW, Benner SA, Cleland CE, Lineweaver CH, McKay CP, Wolfe-Simon F. Signatures of a Shadow Biosphere. *Astrobiology*. 2009;9(2):241-249. doi:10.1089/ast.2008.0251
59. Peretó J. Erasing Borders: A Brief Chronicle of Early Synthetic Biology. *J Mol Evol*. 2016;83(5-6):176-183. doi:10.1007/s00239-016-9774-4
60. Cleaves HJ, Butch C, Burger PB, Goodwin J, Meringer M. One Among Millions: The Chemical Space of Nucleic Acid-Like Molecules. *J Chem Inf Model*. 2019;59(10):42664277. doi:10.1021/acs.jcim.9b00632

61. Cheng LKL, Unrau PJ. Closing the Circle: Replicating RNA with RNA. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010;2(10):a002204-a002204. doi:10.1101/cshperspect.a002204
62. Tjhung KF, Shokhirev MN, Horning DP, Joyce GF. An RNA polymerase ribozyme that synthesizes its own ancestor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(6):2906-2913. doi:10.1073/pnas.1914282117
63. Scherer S, Wollrab E, Codutti L, et al. Chemical Analysis of a “Miller-Type” Complex Prebiotic Broth: Part II: Gas, Oil, Water and the Oil/Water-Interface. *Orig Life Evol Biosph*. 2017;47(4):381-403. doi:10.1007/s11084-016-9528-8
64. Langton CG, ed. *Artificial Life: An Overview*. 1. MIT Press paperback ed., 5. print. MIT; 1998.
65. Cheng G, Pérez-Mercader J. Polymerization-Induced Self-Assembly for Artificial Biology: Opportunities and Challenges. *Macromol Rapid Commun*. 2019;40(2):1800513. doi:10.1002/marc.201800513
66. Jia TZ, Fraccia TP. Liquid Crystal Peptide/DNA Coacervates in the Context of Prebiotic Molecular Evolution. *Crystals*. 2020;10(11):964. doi:10.3390/cryst10110964
67. Pavlov V, Klabunovskii E. Homochirality Origin in Nature: Possible Versions. *COC*. 2014;18(1):93-114. doi:10.2174/13852728113179990033
68. Khan MS, Jenkins J, Yoma NB. Discovering New Worlds: A review of signal processing methods for detecting exoplanets from astronomical radial velocity data [Applications Corner]. *IEEE Signal Process Mag*. 2017;34(1):104-115. doi:10.1109/MSP.2016.2617293
69. Schwieterman EW, Kiang NY, Parenteau MN, et al. Exoplanet Biosignatures: A Review of Remotely Detectable Signs of Life. *Astrobiology*. 2018;18(6):663-708. doi:10.1089/ast.2017.1729
70. Chu D, Ho WK. A Category Theoretical Argument against the Possibility of Artificial Life: Robert Rosen’s Central Proof Revisited. *Artificial Life*. 2006;12(1):117-134. doi:10.1162/106454606775186392
71. Szathmáry E. The origin of replicators and reproducers. *Phil Trans R Soc B*. 2006;361(1474):1761-1776. doi:10.1098/rstb.2006.1912
72. Baum DA. The origin and early evolution of life in chemical composition space. *Journal of Theoretical Biology*. 2018;456:295-304. doi:10.1016/j.jtbi.2018.08.016
73. Kun Á, Santos M, Szathmáry E. Real ribozymes suggest a relaxed error threshold. *Nat Genet*. 2005;37(9):1008-1011. doi:10.1038/ng1621
74. Boyer S, Biswas D, Kumar Soshee A, Scaramozzino N, Nizak C, Rivoire O. Hierarchy and extremes in selections from pools of randomized proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*.

2016;113(13):3482-3487. doi:10.1073/pnas.1517813113

75. Pressman AD, Moretti JE, Campbell GW, Müller UF, Chen IA. Analysis of in vitro evolution reveals the underlying distribution of catalytic activity among random sequences. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(14):8167-8179. doi:10.1093/nar/gkx540

3. Conceptualizing and making life in the laboratory

This chapter gathers the main body of the anthropological part of the thesis, which is completed by part 4.1. It is divided into 2 sub-chapters elaborated from ethnographic descriptions, interviews and the reading of proposals and scientific publications of the laboratory.

Part 3.1 introduces the research practices associated with the two experimental projects reported in this thesis: microfluidic protocells synthesis and RNA networks synthesis (chapters 4.2 and 5.2). It takes as a common thread the different moments of visualization associated with the work of Wen and Ivan, two post-doctoral fellows (all names have been changed except for those of Philippe and Andrew, the 2 principal investigators of the laboratory). The two projects consist of synthesizing artefacts that I call "protolives" (*protovies*), i.e., prototypes of living beings that are supposed to be part of a progression towards life. For researchers, these protolives are therefore situated somewhere between the non-living and the living with varying degrees of liveness. The analysis of the moments of visualization testifies to a common work of interpretation of physico-chemical phenomena into manifestations of life properties, a work that I call "extension of the biological gaze". However, this analysis also shows different interactions between the researcher and his protolives depending on the project: Wen does not take his eyes off his protocells displayed live on his screen like a "portal to another world", whereas Ivan only deciphers traces of his invisible RNA in the form of dark stains on a gel. This part is adapted from: Jeancolas, C. "Water droplets and dark stains. Visualizing the prototyping of life in the laboratory", presented for the "Visualizing the Origins of Life" conference, La Fémis, Paris Observatory, 2021.

Section 3.2 goes deeper into the ethnography of the laboratory and the protolife research projects (mainly from 2010 to 2020, before the COVID crisis). In 3.2.1, we show how the laboratory functions, first as a place, then as a team, and we present the diversity of the collective of humans and non-humans that make it up. In particular, we show how the interpretation of some artefacts into protolives has historically taken place within the group. In section 3.2.2, we highlight the conceptions of life held by researchers in the laboratory. These conceptions offer a privileged place to Darwinian evolution and are related to a certain epistemic culture with which the newcomers are confronted. In 3.2.3, we provide an overview of the protolives synthesized and published in the scientific literature. We explain how they work and show which properties make them eligible for interpretation as prototypes of living beings. Then in 3.2.4, we provide an ethnographic description of the fabrication and interpretation of these artefacts into protolives. And finally in 3.2.5 we make a conceptual clarification of what a protolife is, and what it is not, based on the previous developments in the chapter and on the comparison with concepts elaborated by researchers in the natural and social sciences. All the names, but the ones of Philippe and Andrew, have been changed.

3.1. Water droplets and dark stains: visualizing the making of (proto)life

3.1.1. Extending the biological gaze

Living beings, material bearers of life, are visible to the naked eye or by technological means. Unfortunately, we do not have beings that can directly testify to the origin of life, beings situated somewhere between the non-living and the living. To get around this dead end, researchers from all over the world are involved in an enterprise to make such entities.

The idea that synthesizing life, would allow its understanding (and that of its origin) is very present in the culture of laboratories, devoted to origin-of-life studies. But until today, we are still far from such a making. That being said, we are already well advanced in the stage of prototyping life, which is the making of prototypes of living beings, which I call "protolives" (*protovies* in French) (see part 3.2.5 for a deeper characterization). Located somewhere between the non-living and the living, the protolives are synthetic objects designed to be engaged in a progression towards the living, that is to increase their degree of liveness.¹ The absence of a consensual definition of life within the scientific community,² causes these artefacts to tend towards, what their makers consider as "living". In this sense, they embody the conceptions of life of their designers.

These protolives, or their traces, are visible by means of an adequate technological apparatus that allows an abundant production of images. The involved researchers show an extension of what the historian Evelyn Fox Keller calls the "biological gaze";³ that is the look at living beings in science laboratories, more and more technologically mediated and coupled to operations of transformation. The scientists, involved in this work of extension, interpret visual signals of technical physico-chemical processes as life processes, such as reproduction. Their goal is to detect such processes acquired by protolives to shed light on the transition from non-living to living things. This extension of the biological gaze constitutes the reverse movement of the authentically biological concept creation described by Georges Canguilhem.⁴ It is not the technical interpretation of biological phenomena, such as Aristotle's association of blood circulation with the irrigation of a garden by canals,⁵ but the biological interpretation of technical phenomena.

It is also through visualization that the scientists interact with their protolives whose fragile developments they must maintain. They are, thus, part of a work similar to what the anthropologist Natasha Myers calls "the care for the molecule",⁶ that is the long-term work researchers must produce to preserve the integrity of their biochemical artefacts.

The Laboratory of Biochemistry (LBC) of ESPCI Paris - PSL is, among others, the scene of such protolife making and observation. In this laboratory, the protolives produced are mainly protocells that are visible as water droplets under the microscope, and RNA, molecules close to DNA, whose traces are visible as dark stains on electrophoresis gels (Figure 1). In what way do the moments of visualization inform on the relationship that researchers have with their protolives? How do they interpret these observed images of technical processes as acquisitions of life properties?

To answer these questions, I will analyze productions and interpretations of images by relying on two years of participant observation at the Laboratory of Biochemistry, not as an ethnologist

studying scientific methods, but as a scientist engaged in a reflexive anthropological approach. First, I will characterize the use of microscopy to visualize and interact with protocells, in the form of water droplets visible on a screen. Then, I will document the making and visualization of gels to reveal traces of chemical reactions between RNAs, in the form of dark stains. Finally, I will show how the use of these different visualization techniques informs us on the relationship between researchers and their protolives.

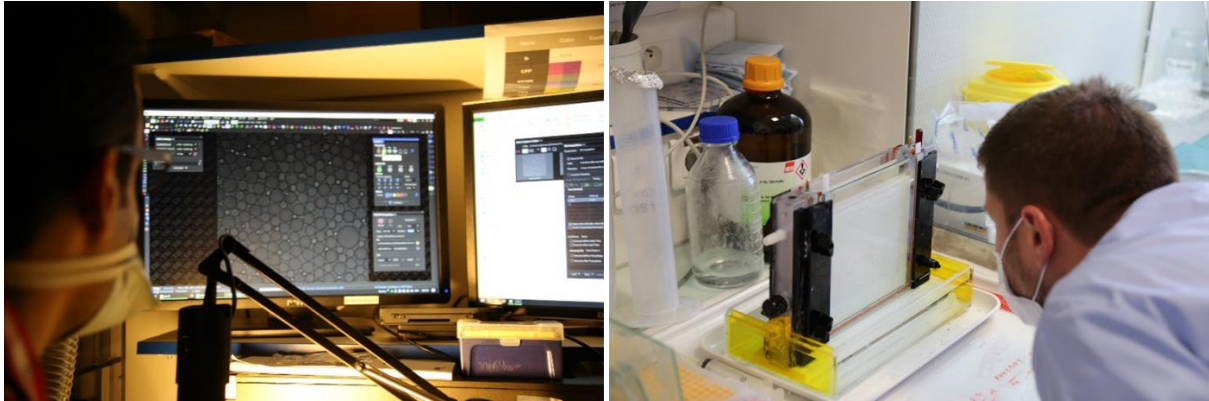


Figure 9. On the left. Wen, a postdoctoral researcher at the LBC, looks at water droplets on his screen. On the right. Ivan, also a postdoctoral researcher of the lab, examines a gel he is preparing.

3.1.2. Tracking water droplets on a screen

Wen is in the microfluidic room in front of the screen connected to his microscope, in the light of a desk lamp. As usual, the rest of the room is in darkness, cold air conditioning, and in the continuous background noise of the machines. A camera screwed to the microscope allows him to visualize on the screen the formation and movement of water droplets, generated in an oil phase inside a microfluidic chip. With his left hand on the joystick, he gently moves the base on which the chip rests. He looks at the different microfluidic channels showed on the screen. With his right hand on the computer mouse, he moves the cursors on the screen to decrease or increase the pressure of the different fluids in the chip. Thus, he makes the microscopic water droplets stop or circulate through the channels. Each gesture is extremely precise. Small variations of pressure at this scale can induce brutal behaviors of the fluids and abort the experiment. All throughout the operation, Wen's eyes are riveted on his screen (Figure 2).

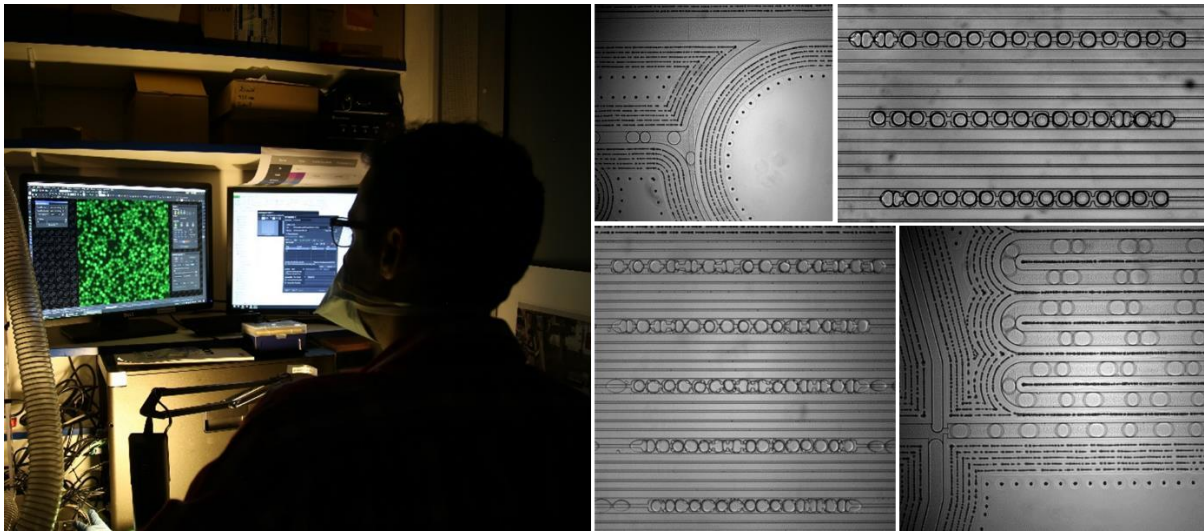


Figure 10. On the left, Wen is in the microfluidic room. He is staring at his screen which displays the drops he is manipulating live. On the right, Images of the microfluidic chip broadcasted on the screen. By moving the camera, Wen visualizes different places of the microfluidic chip where the droplets are circulating. For video excerpts of the droplet circulation, see: <https://vimeo.com/573092599>; <https://vimeo.com/573090188> and <https://vimeo.com/573091440>. To visualize the droplet growth, see: <https://vimeo.com/573094481>.

Soon, the droplets should stabilize in rows, one after the other. The aim of this experiment is to isolate physico-chemical processes carried out by the water droplets. Wen has already performed this type of experiment. Two populations of droplets differ by their chemical composition: the first one, called "efficient", maintains a network of chemical reactions, and the second one, called "inefficient",¹ cannot do so, because of a deficit in a molecular species. Through an osmotic process, Wen expects that this will result in the growth of the first population at the expense of the second. However, for him, these are not just droplets, but protocells whose variation in chemical composition (here understood as genotype) induces a variation in droplet size (here understood as phenotype). Interpreted in this way, these protolives are part of the beginning of a Darwinian evolution, a central notion in the conception of life held in the Laboratory of Biochemistry.

While Wen has relative freedom of interpretation, these images are nonetheless what Lorraine Daston and Peter Galison would call "mechanical objectivity".⁷ The images generated on the screen are automatically produced by the microscope, and reveal all the defects of the circuits and droplets as they are. Wen is well aware of these defects. *He has just spotted a dust particle in a channel, which he has to dislodge without compromising the positioning of the droplets. He plays with the pressure cursors on his screen. Sometimes he gently repositions a tube connected to the chip. His activity combines body techniques and technological manipulations. Glances, reactivity, and precision of the fingering are associated with the variations of currents, within the world of the microfluidic chip.* The microscope acts here as a "technical portal to

¹ See part 4.1 for a discussion about the terms used to refer to the droplets.

another world", to use Hannah Landecker's expression applied to the first historical images of cell microscopy.⁸ Wen is thus immersed into a world invisible without technological mediation, in which he is both an observer and an actor. "Immersed" is surely the most appropriate term. It is reminiscent of the underwater scientific expedition via a remotely operated vehicle, described by the anthropologist Stefan Helmreich in his ethnography of marine microbiology.⁹ The scientists, aboard a boat on the surface, are nonetheless immersed in the depths of the ocean as observers, via the images transmitted live by the robot, and as actors who can control the robot remotely, using joysticks. The same is true in the dark room, where Wen accesses the aqueous world of the microfluidic chip, located at a scale inaccessible to the naked eye.

The droplets have stabilized properly. Wen turns off the lamp, leaves the room, and sits at his desk in the neighboring room. His computer displays the same screen as in the microfluidic room. He notices that the oil-water interface, at the entrance of the droplets zone, is dangerously unstable. Untroubled, he adjusts the cursors until it stabilizes. From now on, there is no more microscopes. He is alone facing his screen, a portal opened to another world, in which he immerses himself for 4 hours. His work is now of another kind. He has to protect his fragile protolives against the advances of the fluids, which could sweep them away in a few seconds. He has another screen on which he reads a scientific paper, but his multiple glances are directed towards the digital portal (Figure 3). His colleagues know not to disturb him.

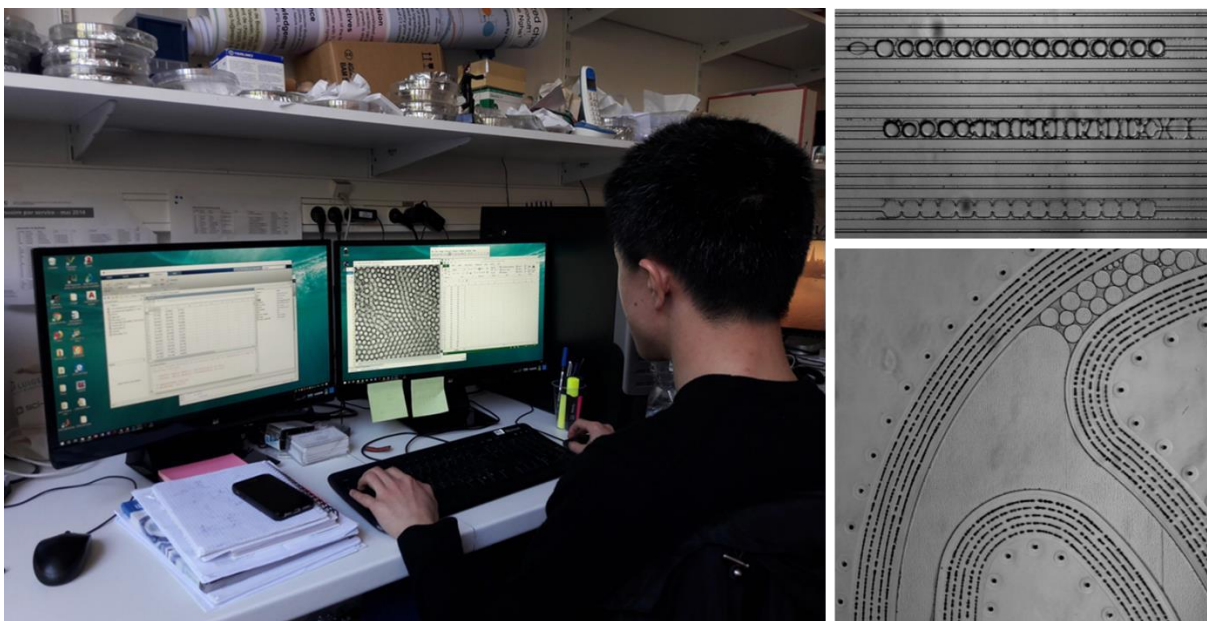


Figure 11. **On the left.** Wen monitors and manipulates the microfluidic chip remotely from his office. **On the right.** Images of the microfluidic chip displayed on the screen. A moment of inattention and the droplets are flushed away by the water. **At the top,** an image showing rows of water droplets being flushed away by a water flow (see <https://vimeo.com/573095970> for a video extract). **At the bottom,** an image showing the origin of the water flow. Wen has to stabilize this area to avoid any overflow (see <https://vimeo.com/573095161> for a video extract).

3.1.3. Identifying dark stains on a gel

In an adjacent room, Ivan, another researcher, is pipetting small volumes on his bench. The large windows fill the room with sunlight. But, unlike Wen in the dark microfluidic room, Ivan is working blind. The RNA solutions he's handling are all as colorless as water. To find his way around, he can only rely on the handwritten markings on the tubes, or the labels printed on them. Earlier in the week, a colleague confided to a high school trainee: "Research is 75% of the time writing on tubes". This remark fits well with Bruno Latour's laboratory ethnography,¹⁰ in which he observes that literary inscription is by far the main activity of the researchers. Scattered throughout Ivan's workspace, inscriptions of a different kind call out. On adhesive tapes, "RNA only", "do not touch" or "RNA zone" are written in felt pen. These signs refer to the precautions to be taken by colleagues, who are forbidden to touch anything in the zone, without clean gloves. RNAs are indeed very sensitive to external contaminations that can degrade them. The biochemists working with RNA in the lab are forced to adopt an attitude that they themselves describe as necessarily "paranoid". The invisibility of contaminations makes them likely to be everywhere, at any time, implying a constant work of care.

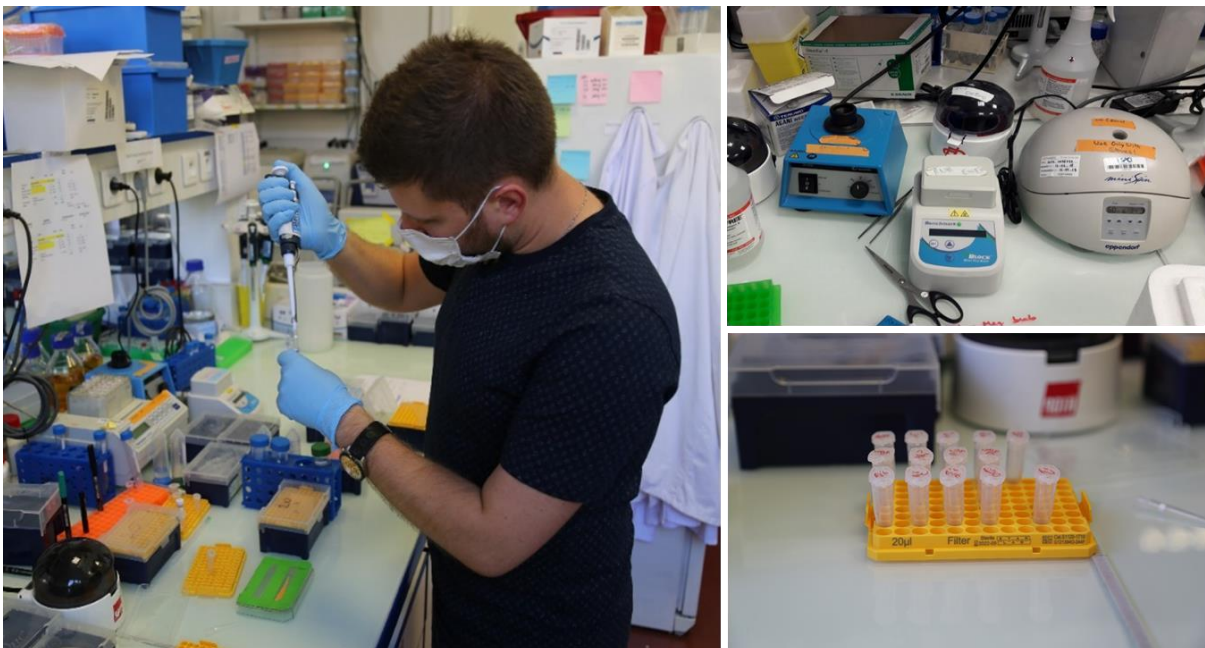


Figure 12. **On the left.** Ivan is pipetting various RNA solutions into small plastic tubes. **Top right.** Labels are taped to the machines in the RNA area warning other handlers not to touch them unless proper precautions are taken. **Bottom right.** A series of small plastic tubes containing RNA and differentiated by markings in felt pen on their caps.

The RNA solutions that Ivan manipulates are instances of protolives, like Wen's water droplets. They too are manipulated in order to bring out physico-chemical processes, like catalysis, here interpreted as life processes, like reproduction. Still within the framework of the emergence of a Darwinian evolution, Ivan makes RNA react to allow them to reproduce. The traces of these processes can only be visualized after the experiment.

A few hours later in the afternoon, Ivan is in another room. There, he makes the electrophoresis gel that will enable him to visualize traces of the RNAs, which were reacting for several hours (Figure 5). After assembling a mold, with glass plates and plastic rods, he carefully pours a viscous mixture into it, that slowly solidifies into a gel. He has a series of small plastic tubes in

front of him. They contain samples of the reaction solution collected at different times. This series of tubes then corresponds to the temporal evolution of the reaction studied. Delicately, he pipettes each solution from the tubes to the top of the gel. He connects the structure to an electrical generator and returns to his office. Two hours later, he comes back, unmolds the gel, and soaks it in a translucent solution. After a moment, he opens a trunk on the bench, places the gel in it and closes the door. He does some manipulations on the computer screen besides it, and triggers an illumination of UV rays. A picture appears on the screen: a set of dark stains, arranged vertically and horizontally on a gray background, is visible on a photograph. Ivan stares at the stains, looking concerned (Figure 6). He records the image and returns to his office where he displays it for better observation.

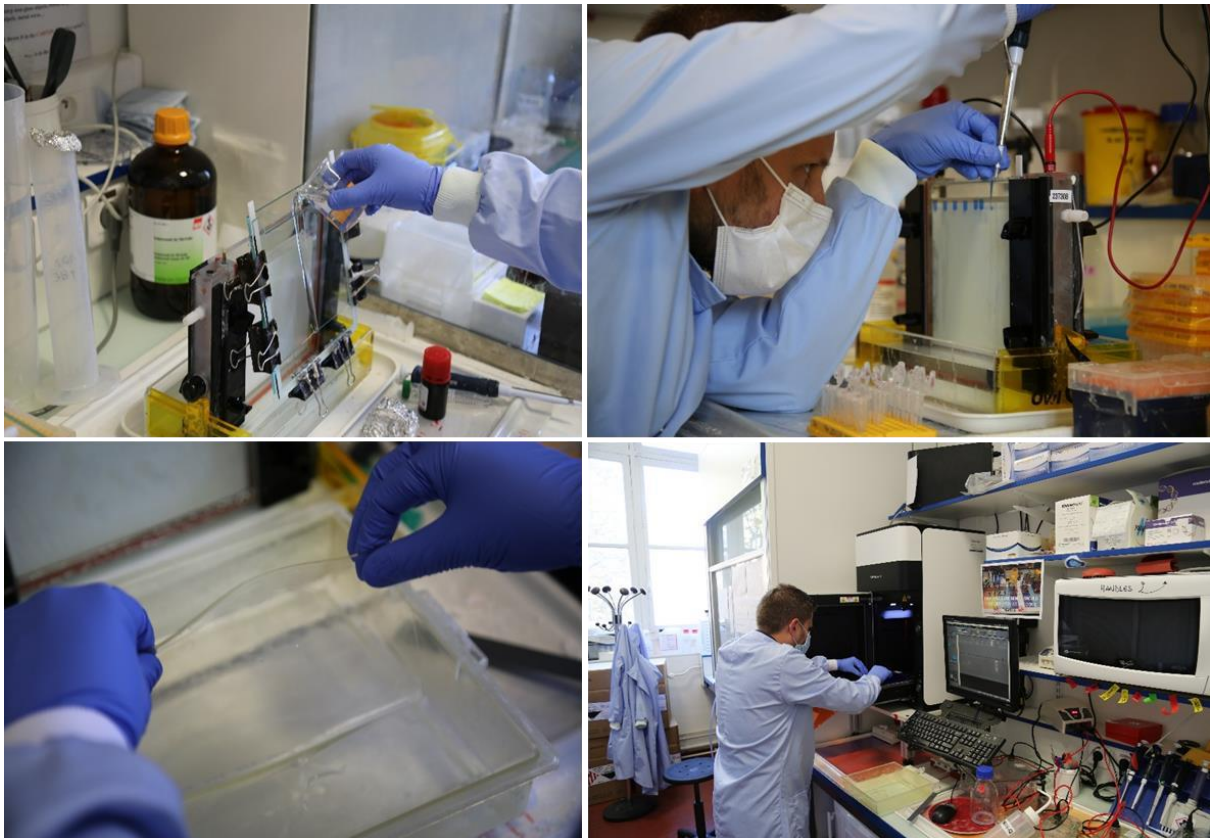


Figure 13. **Top left.** Ivan pours the liquid gel into the mold. **Top right.** He fills the pockets of the solidified gel with solutions containing reacted RNA. **Bottom left.** He takes the gel out of a bath after soaking it to stain RNA. **Bottom right.** He places the gel in the visualization box to generate an image of the dark spots.

Electrophoresis gels are epistemic objects, in the category of what the philosopher Hans-Jörg Rheinberger would call "preparations".¹¹ At the intersection between research objects and instruments, they constitute a manufactured medium in which RNAs, that absorb UV light, are made visible. They offer a combination of viewing modes in the form of "enhancement", "compression" and "dilatation", in Rheinberger's terminology. They are enhancements, because they reveal the presence of RNA by dark stains, otherwise invisible to the naked eye (Figure 6). Gels are also compressions of time, because the arrangement of the stains along the horizontal axis recapitulates different moments of the chemical reaction studied. And finally, the gels are dilatations of space, because the arrangement of the stains along the vertical axis separates the RNAs according to their size, whereas they were before mixed in solution. By looking at a gel,

Ivan does not have direct access to a portal to another world like Wen, but he does have access to traces of the activity of his protolives. His activity is curiously close to that of the astrobiologists described by the anthropologist Istvan Praet.¹² They indeed analyze an "ultraviolet world" emitted by the celestial bodies to find signatures of life. Like the latter, Ivan has access to an ultraviolet world in which he searches for traces of life. This exercise is all the more difficult because the reaction is complex, since each stain only indicates the presence of RNA of a particular size. The interpretation of these stains into chemical reaction networks, and then into acquisitions of life properties, is then subjected to what Galison and Daston would call "trained judgment."⁷ Unlike Wen's camera, Ivan's gel is dependent on its sometimes complicated preparation. Some characteristics of gel images can then be attributed to manufacturing defects. The researcher must then redouble his efforts to distinguish technical artefacts from phenomena to be studied.

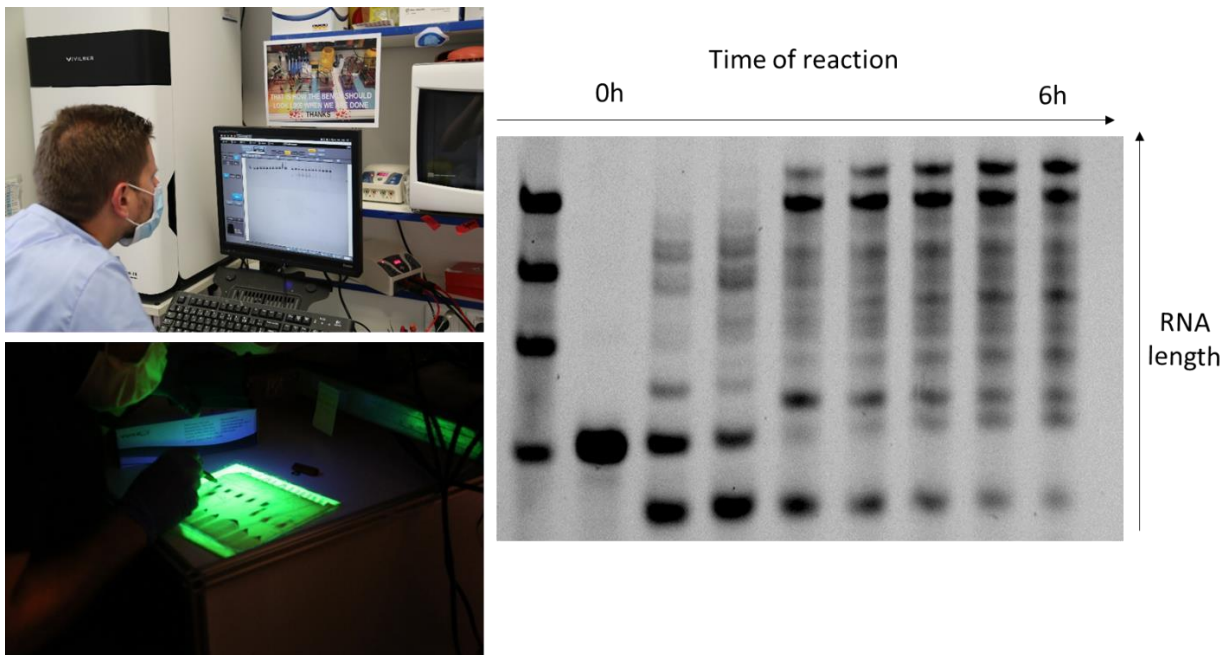


Figure 14. Top left. Ivan looks at the dark stains distributed on an image of the gel on the screen after UV illumination in the visualization box. **Bottom left.** This is another mode of visualization of RNA gels. Ivan placed himself in the dark microfluidic room. Using a UV flashlight, he can distinguish the dark stains on the gel that he circles with a felt pen. **On the right.** Image of a gel showing the evolution of an RNA reaction. Each column corresponds to a precise moment of the reaction (except the first one which corresponds to a length ladder). The RNAs are distributed along the entire length of each column according to their size. Each spot corresponds to the presence of a population of RNA of a certain length at a specific time.

3.1.4. Visualization techniques and the attitudes towards protolives

The two types of protolives we have encountered, droplets and RNA systems, have almost nothing in common on a material or visual level. The droplets are the result of an emulsion of water in synthetic oil. The whole microfluidic system is in extreme chemical conditions, unfit for life as we know it. The other protolives described, are made of the same types of RNA common to all known living beings. However, it is not their biological nature that interests the laboratory's researchers, but the processes they can generate with it. For them, as explained by the philosophers John Dupré and Daniel Nicholson, life is above all processual.¹³ And the process at the center of the laboratory's concerns, is that of Darwinian evolution, taken as a combination of reproduction, heredity, variation, and selection, regardless of the material support. Thus, the growth of droplets, as well as the molecular reproduction of RNA, are processes that serve the same conception according to which life is inseparable from evolution.

Just like the life processes at the individual scale, the processes that researchers want to visualize are very fragile. The long road to the final image production is full of hazards, failures, and doubts. Wen and Ivan have to be constantly vigilant towards their protolives, with which they are emotionally entangled. Wen does not take his eyes off his droplets for long hours, and monitors the chip as best as he can. Ivan is in dismay, when after a long day of labor, the gel displays no stain. Did he not protect his RNA enough from contamination? Was he negligent in any step of the protocol? "Nothing is more frustrating than not seeing anything", he once said. If this affective labor may be shared with other researchers in the laboratory in contact with fragile material, the work of extending the biological gaze to non-living objects is for sure specific to the making of protolives.

The extension of the biological gaze requires the scientists to bring out physico-chemical processes to be interpreted as life related. However, these processes must be attributed, at least partially, to the protolives' agency if they want to set in motion spontaneous behaviors (see Chapter 2). This implies a constraint on what the anthropologist Perig Pitrou calls the "agentive configuration",¹⁴ in which the life processes of a living being are distributed according to whether human or non-human agents are the cause. For protolives in the laboratory, some phenomena are the work of the experimenter or a machine, such as droplet formation, but others can be directly attributed to the protolives, such as droplet growth. If visualization techniques are needed to the detection of such processes, mathematical analyses of the images are often essential to reveal what the eye does not perceive. Thus, the analysis of the growth rates of the droplets and of the intensities of stains proved to be decisive for the application of the biological concepts of heredity and reproduction, for instance, to these protolives (Figure 7). In the words of Daston and Galison, the "mechanical objectivity" of the droplet images and the "trained judgment" associated with the gel images are then complemented by the "structural objectivity" of the mathematical analysis.⁷

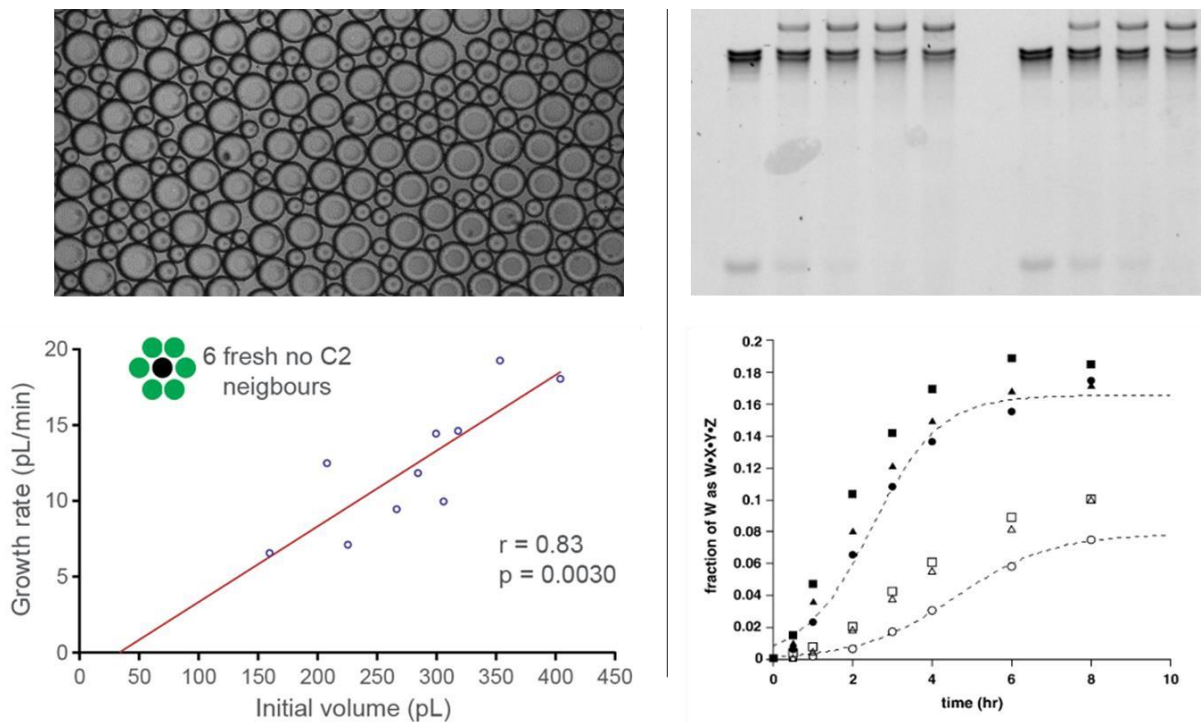


Figure 15. On the left. Representation of a linear regression allowing to deduce the perceived heritability property in the droplet population (image from chapter 4.2). On the right. Kinetic curves whose mathematical parameters allow to deduce the reproduction property in a population of RNA (image adapted from¹⁵ with permission).

These ethnographic elements have thus shown us the centrality of visualization techniques applied to different protolives. Whether it is a portal to another world, such as microscopy, or an image of traces to be deciphered, such as electrophoresis gel, the visualization tool allows researchers to interact with their protolives, to manipulate and protect them. And finally, this is also the instrument by which they interpret their behaviors in the light of the origin of life.

References

1. Malaterre C. Lifeness signatures and the roots of the tree of life. *Biol Philos.*

- 2010;25(4):643-658. doi:10.1007/s10539-010-9220-8
2. Popa R. *Between Necessity and Probability: Searching for the Definition and Origin of Life*. Springer; 2004.
 3. Keller EF. The Biological Gaze. In: Robertson G, ed. *FutureNatural. Nature, Science, Culture*. London - New-York: Routledge; 1996:107-121.
 4. Canguilhem G. L'expérimentation en biologie animale. In: *La Connaissance de La Vie*. Vrin. Paris; 2015:19-49.
 5. Aristote. *Des Parties Des Animaux*.
 6. Myers N. *Rendering Life Molecular - Models, Modelers and Excitable Matter*. Durham and London: Duke University Press; 2015.
 7. Galison P, Daston L. *Objectivity*. New-York: Zone Books; 2007.
 8. Landecker H. Creeping, drinking, dying: The cinematic portal and the microscopic world of the twentieth-century cell. *Sci Context*. 2011;24(3):381-416. doi:10.1017/S0269889711000160
 9. Helmreich S. The message from the mud. In: *Alien Ocean*. Berkeley: University of California Press; 2009:1-30.
 10. Latour B, Woolgar S. *Laboratory Life. The Construction of Scientific Facts.*; 1979. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 11. Rheinberger H-J. Making Visible. Visualization in the Sciences – and in Exhibitions? In: Lehmann-Brauns S, Sichau C, Trischler H, eds. *The Exhibition as Product and Generator of Scholarship*. Max-Planck-Inst. für Wissenschaftsgeschichte; 2010:122.
 12. Praet I. Astrobiology and the Ultraviolet World. *Environ Humanit*. 2017;9(2):378-397. doi:10.1215/22011919-4215352
 13. Nicholson DJ, Dupre J. Towards a Processual Philosophy of Biology. In: Dupré J, Nicholson DJ, eds. *Everything Flows: Towards a Processual Philosophy of Biology*. Oxford Uni. Oxford; 2018:9-10. doi:9780198779636
 14. Pitrou P. Life Form and Form of Life within an Agentive Configuration: A Birth Ritual among the Mixe of Oaxaca, Mexico. *Curr Anthropol*. 2017;58(3):360-380. doi:10.1086/692027
 15. Hayden EJ, Lehman N. Self-Assembly of a Group I Intron from Inactive Oligonucleotide Fragments. *Chem Biol*. 2006;13(8):909–918. doi:10.1016/j.chembiol.2006.06.014

3.2. Concevoir, fabriquer, interpréter et restituer des protovies

3.2.1. Le laboratoire de biochimie de l'ESPCI : berceau de vivants et protovivants

3.2.1.i. L'ESPCI

Nous avons vu en partie 3.1 des chercheurs visualisant des artefacts physico-chimiques de leur propre production. Rien d'étonnant pour une École de « physique et de chimie industrielle ». Cependant leur travail actif d'interprétation de ces phénomènes en processus vitaux paraît surprenant, n'ayant à première vue absolument rien à voir avec une quelconque application industrielle. Cette entreprise semble en contradiction avec l'ambition initiale de l'École qui « a pour but de former des chimistes et des physiciens pour l'industrie »¹ et qui « ne doit pas avoir pour but de faire concurrence à la Sorbonne ni de créer des professeurs ou des docteurs »,² selon les dires du cofondateur de l'École Charles Lauth. Une brève observation des façades de l'École nous en informe sur l'origine et l'évolution des vocations de ce lieu.

Sur la grille qui longe la façade rue Pierre Brossolette dans le 5^{ème} arrondissement de Paris, l'École expose son histoire sur une série de panneaux. Les principales personnalités, inventions et découvertes y sont illustrées, alternant avec les exposés des différents travaux de construction d'envergure qui se sont étalés tout le long du XX^{ème} siècle, et qui donnent au bâtiment son allure d'aujourd'hui. Monumental, s'élevant à près de 80 mètres, sur une surface de 40 000 m², cet imposant édifice en briques rouges ressemble à une usine, juchée sur la montagne sainte Geneviève du quartier latin de Paris. Un des premiers panneaux expose la « création » de l'École en 1882 qui doit répondre à « la nécessité de former des chimistes et des physiciens destinés à la recherche industrielle », tout cela « dans le contexte qui suit la guerre de 1870 ». La défaite française face à la Prusse a en effet privé le pays d'une partie de son territoire, emportant l'École de chimie de Mulhouse, pionnière depuis 1822 dans l'enseignement des sciences et de la chimie pour des applications industrielles. Dans un contexte nationaliste exacerbé, Charles Lauth, industriel, chimiste et « vrai Français »² écrit au Ministre du Commerce en 1878 que « L'Exposition [universelle] de 1878 a montré que, sur certains points considérés naguère comme invulnérables, nos industries nationales sont sérieusement battues en brèche par la concurrence étrangère ».³ Après délibération, et Lauth siégeant lui-même au Conseil Municipal de la Ville de Paris, l'instauration de l'École est mise à l'ordre du jour le 22 décembre 1880 au Conseil,⁴ et sa ouverture s'en suit trois ans plus tard. Les panneaux sur la grille exposent les grands noms, physiciens et chimistes, de l'établissement (Paul Langevin, Pierre et Marie Curie, Georges Charpak etc.) ainsi que les inventions et les



Figure 16. Façades de l'ESPCI. À gauche, une série de panneaux expose l'histoire de l'École de sa création à nos jours. À droite, des bas-reliefs présentent des scientifiques connues de l'école, et des mosaïques montrent les objets scientifiques, naturels ou artificiels, qui ont fait leurs renommés.

disciplines fondamentales phares (le sonar, la physique statistique, la chimie macromoléculaire, etc.). Le tout est illustré de photographies de scientifiques et de leurs objets de recherche formant un réseau d'humains et non-humains qui font la science. Ces réseaux sont encore plus manifestes plus loin dans la rue. La façade de l'École y est parsemée de bas-reliefs représentant les bustes de grands noms de la physique-chimie ou de l'École dont Lavoisier, Ampère et Curie,¹ entourés de mosaïques présentant inventions et phénomènes naturels liés à l'optique, l'électricité, la mécanique, etc. Cette fresque qui met en avant autant les humains que les nonhumains précède pourtant d'une cinquantaine d'années la théorie de l'acteur-réseau de Bruno Latour et Michel Callon qui donne une part aussi importante aux objets qu'aux personnes pour être acteurs de la société comme de la science.⁵

Le tour de l'École nous amène enfin rue Vauquelin, devant une façade dont les vitres des larges fenêtres mettent en scène les icônes choisies de l'École² sur des photographies de plusieurs mètres : Pierre Curie, Marie Skłodowska-Curie, Paul Langevin, Frédéric et Irène Joliot-Curie, Georges Charpak et enfin Pierre Gilles de Gennes. Nous en apprenons plus sur ce dernier avec une plaque en marbre, entre les photographies et l'entrée principale : « Homme de grande culture, mondialement reconnu et admiré, Pierre-Gilles de Gennes est l'auteur de contributions pionnières dans un nombre considérable de domaines allant de la physique à la biologie ». Directeur de l'ESPCI de 1976 à 2003, « Newton de notre temps », il introduit la biologie dans l'École dans les années 1990 dont les premiers locaux se résument à un bâtiment préfabriqué de plein pied remplaçant le terrain de tennis dans la cour.

Après avoir franchi l'accueil, nous nous retrouvons dans la cour centrale. Sa surface est presque entièrement bétonnée, parsemée de bâtiments en préfabriqué, à l'exception d'un petit jardin sur la droite. Nous le traversons et montons l'escalier du bâtiment juste derrière. Au deuxième étage, une feuille est scotchée sur le bâtant d'une porte entrouverte : « LBC Laboratoire de BioChimie ».

¹ Il s'agit ici de Pierre Curie. Étonnement, Marie Skłodowska-Curie est absente de la fresque, bien qu'étant la première personne au monde à avoir reçu deux prix Nobel (et la seule à l'époque de la construction de la fresque en 1932).

² Installation mise en place dans les années 2010. Si Marie Skłodowska-Curie y figure, on notera qu'il s'agit de la seule femme présente sur l'ensemble des façades de l'École.

3.2.1.ii. Le laboratoire de biochimie

Derrière la porte, nous arrivons à l'extrémité d'un long couloir dont les salles de part et d'autre constituent le Laboratoire de biochimie de l'ESPCI. Il s'agit d'une journée chargée, la plupart du personnel est présent aujourd'hui. Des femmes et des hommes, entre la vingtaine et la trentaine, se croisent, se rencontrent et discutent. Un groupe de trois personnes, face à un poster, est traversé par une jeune femme en blouse blanche marchant d'un pas ferme, un tube de solution translucide à la main. Une personne du groupe explique quelque chose aux deux autres personnes attentives malgré les allers et venues réguliers des autres chercheurs. « Sorry ». Une autre personne traverse le groupe, les deux mains chargées d'un bac de glace recouvert d'une multitude de petits tubes en plastique. Imperturbable, le groupe se décale et la discussion se poursuit. On y parle un anglais simple teinté d'un accent propre à chaque individu. Dans le laboratoire, Français, Italiens et Indiens se côtoient toute la journée avec Autrichiens, Croates ou encore Iraniens. Au sein de cette communauté d'une quarantaine de personnes, un tiers à peu près sont des femmes. Si les femmes sont plus représentées ici que dans les laboratoires de physique voisins, le laboratoire n'échappe pourtant pas au « plafond de verre » du monde académique même en biologie, malgré une forte présence féminine dans les études correspondantes.⁶

Tout comme l'École expose ces activités et découvertes sur ses murs, le laboratoire raconte les siennes sur les murs du couloir le long desquels s'enchaînent les posters. En regardant ces derniers, un point commun essentiel ressort : il y est presque systématiquement fait mention de « microfluidique en gouttelettes », une technologie permettant de générer de microscopiques gouttes d'eau en émulsion dans une huile synthétique. Bactéries, levures, neurones, cellules cancéreuses... Les scientifiques semblent mettre dans ces gouttes tous les êtres vivants suffisamment petits pour séquencer, observer et diagnostiquer un large éventail de phénomènes biologiques. La génération de plusieurs milliers de ces gouttelettes contenant des cellules permet alors la parallélisation de milliers d'expériences pour produire des résultats en haut débit. Nous comprenons facilement qu'il s'agit de la vocation du laboratoire. En faisant le tour des posters, l'un d'entre eux interpelle. Comme dans les autres, il est toujours question de microfluidique en gouttelettes, cependant ces dernières ne semblent pas contenir des cellules vivantes mais des réactions chimiques entre des glucides. Un autre poster plus loin se distingue encore plus. Cette fois-ci il n'y a ni goutte, ni cellule, mais des schémas d'ARN associés à une photographie de gels présentant des taches sombres. Les deux projets associés portent les noms de Chemfit et Startevo (pour « chemical fitness » et « start evolution » respectivement). À la lecture de ces deux posters, nous pouvons faire le lien avec les observations de gouttes d'eau et les déchiffrages de taches sombres auxquels nous avons déjà assistés ; il ne s'agit donc pas d'êtres vivants mais d'êtres « protovivants » (voir partie 3.1).



Figure 17. Série de posters. Sur les murs du couloir du laboratoire de biochimie, les chercheurs et chercheuses affichent leurs projets et découvertes sur des posters.

Les deux posters en question ne se font pas référence mutuellement ni ne parlent explicitement de « protovies ». Mais parce que les objets produits et exposés sur ces derniers sont explicitement fabriqués pour présenter des propriétés considérées comme vitales (croissance, reproduction, métabolisme entre autres), ils sont bien apparentés. Ils ne sont cependant pas apparentés selon une logique généalogique, à l'instar de l'ensemble des cellules biologiques manipulées et exposées sur les autres posters, censées toutes dérivées d'un même ancêtre commun. Leur parenté peut se comprendre d'une façon « queer » comme l'anthropologue Sophia Roosth l'a suggéré pour les cellules reconfigurées par la biologie de synthèse.⁷ Face à la quantité de nouvelles entités biologiques synthétiques, Roosth se pose la question de la manière dont les scientifiques les classifient. Par exemple, l'artiste Alexandra Daisy Ginsberg ajoute le « règne synthétique »⁸ comme une quatrième branche du célèbre arbre phylogénétique de Carl Woese.⁹ Mais qu'ont en commun ces organismes pour justifier une parenté commune au sein d'un nouveau règne du vivant ? Pour y répondre Roosth utilise la théorie de la parenté *queer* (« queer kinship theory ») développée avec les revendications LGBTQ.¹⁰ Contrairement à la parenté biologique exemplifiée par la famille hétérosexuelle nucléaire, la parenté *queer* s'appuie sur des liens de choix et de décisions rationnelles. Les gènes d'espèces différentes se retrouvent ainsi liées dans un même organisme, non pas parce qu'ils ont un ancêtre commun, mais du fait de la décision rationnelle des biologistes de les mettre ensemble. Les constructions de la biologie de synthèses produisent alors des objets dits « post-naturels » *queers* qui dénaturent le lien biologique unifiant les différents composés d'un même organisme. De même nous pouvons concevoir les objets protovivants du laboratoire à travers une telle parenté, encore plus que les cellules synthétiques. Ces dernières restent essentiellement des cellules biologiques dont la majeure partie est quand même issue d'un ancêtre commun. Mais les

protovies, ici protocellules microfluidiques et réseaux d'ARN, n'ont pour ainsi dire aucune matière ou information partagée, à une exception près. Cette exception est la conception de la vie que l'on retrouve dans le groupe d'individus qui est à l'origine de leur fabrication. C'est-à-dire l'ensemble des priorités qui, selon eux constituent le vivant, et qu'ils implémentent dans différents objets pour mieux comprendre l'apparition de la vie. Tout comme sur les murs de l'École, la vision de ce couloir laisse apparaître un réseau d'acteurs qui font la science. Mais ici, les non-humains sont mis à l'honneur sur les posters desquels les humains sont totalement absents, si ce n'est par leurs noms écrits en petit sous les titres du poster. Ces posters exposent les contextes de justification des travaux scientifiques. Mais dans le couloir, nous pouvons observer les contextes de découverte et assister à un réseau d'humains en circulation continue.

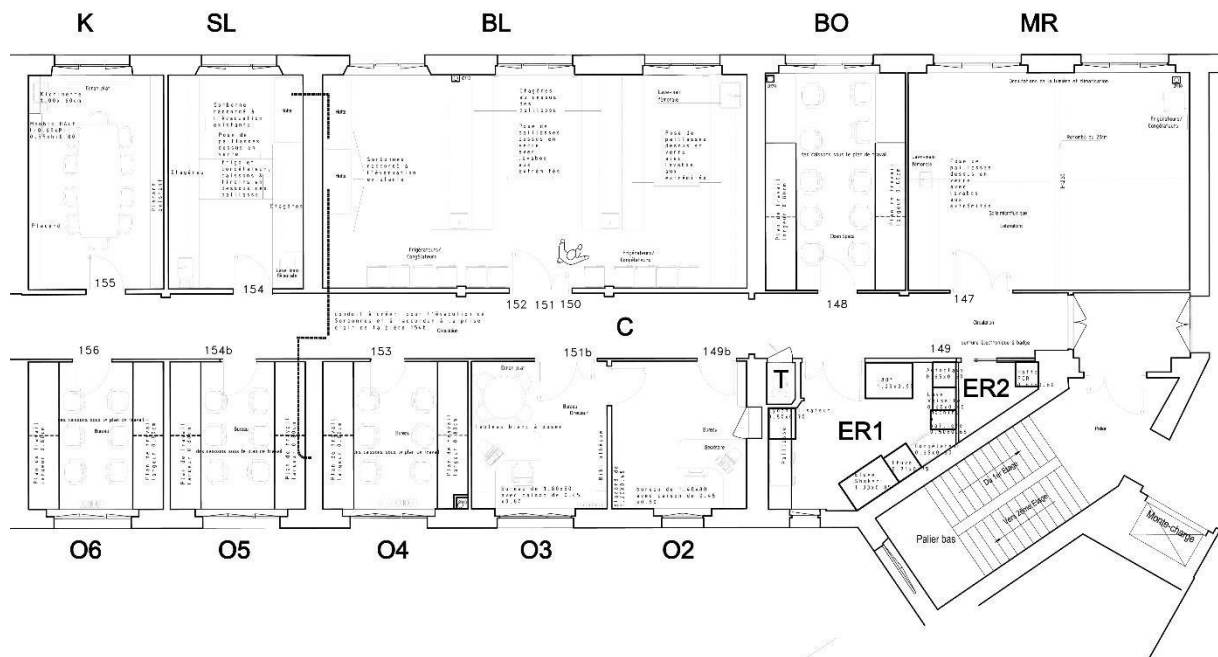


Figure 18. Plan du laboratoire de biochimie. K = cuisine (kitchen). SL = Small Lab. BL = Big Lab. BO = grand bureau (big office). MR = salle microfluidique (microfluidic room). Oi = bureau numéro i (office number i). C = couloir (corridor). ER = salle d'équipement (equipment room).

« Pardon ». Une personne en contourne une autre et rentre dans la première pièce du couloir devant l'entrée : la salle microfluidique. Il s'agit de Wen, post-doctorant d'origine chinoise récemment devenu français, dont la mission principale est de réaliser les expériences de protocellules microfluidiques du projet Chemfit. Il traverse la pièce plongée dans la pénombre, dans une atmosphère fraîche de climatisation, qui sert à maintenir au frais l'ensemble des machines de la salle produisant un son continue de soufflerie. La pièce est divisée en six « stations microfluidiques » qui se composent chacune d'une table, d'une chaise, d'une lampe de chevet, d'un microscope, d'un ordinateur et du matériel nécessaire pour faire fonctionner une puce microfluidique. Chaque station est le résultat d'assemblage et de bricolage nécessitant parfois plusieurs jours avant d'être opérationnelle. Sauf pour quelques chercheurs qui viennent rechercher la pénombre de cette pièce pour visualiser des gels, cette pièce est exclusivement

dévolue à la microfluidique en gouttelettes. Ainsi, cela signifie que lors de la construction des protovies, cette pièce est la garante de la propriété vitale de compartimentation (voir partie 4.1). C'est ici que les compartiments sont formés et jetés en fin d'expérience.

Marie, une post-doctorante, est assise, seule, et observe son écran d'ordinateur sur lequel défile des gouttes contenant des cellules fluorescentes vertes. Wen lui demande s'il peut allumer la lampe de chevet de sa station pour brancher sa puce microfluidique à l'appareillage. Après un moment d'hésitation, elle le lui accorde à condition de baisser la lampe au ras de la table pour limiter la luminosité. Comme elle mesure l'intensité de fluorescence de plusieurs cellules, son expérience est très sensible à toute autre source de lumière que celle émanant de son microscope, ce qui explique la pénombre si souvent associée à cette pièce. Même s'ils sont habitués, les chercheurs vont rarement de gaieté de cœur dans cette salle : « En salle microflu, il fait noir, il fait froid, tu y restes des heures, les expériences ne marchent jamais... la belle déprime quoi ! » pour citer l'un d'entre eux. Les expériences microfluidiques sont en effet réputées très difficiles, et Wen y est particulièrement confronté, d'autant plus que son système diffère beaucoup de celui de ses collègues, notamment par sa sensibilité extrême (voir partie 4.1). Actuellement, il procède à ce qu'il appelle « une incubation de gouttes ».

Le terme a de quoi interpeler. « Incubation » désigne couramment « le développement de l'embryon dans un œuf » ou le « temps qui s'écoule entre l'introduction d'un germe infectieux dans un organisme et les premières manifestations d'une maladie ». ¹ Au LBC, il indique généralement la période nécessaire pour qu'une culture cellulaire atteigne un état souhaité avant de pratiquer une expérience, où généralement elles croissent et se divisent. Comme nous l'avons remarqué, l'expérience de Wen ne comporte pas de cellules biologiques mais seulement des gouttes d'eau contenant des glucides. Durant cette période d'incubation, il espère voir les gouttes d'une population spécifique croître aux dépens d'autres qui rapetissent (voir partie 4.1). Wen travaillait sur des cellules biologiques durant son doctorat et la similarité avec ses protocellules est pour lui très claire : « il faut garder les protocellules fraîches autant que des cellules biologiques (...) de même, il ne faut pas rater le temps d'incubation ». La ressemblance entre manipulation du vivant et du protovivant est encore plus frappante lorsqu'on regarde le détail du protocole que Wen est en train de suivre.

Il met en contact dans une puce microfluidique plusieurs gouttes, dont une population de gouttes dites « efficaces »^{xvii} et une population de gouttes dites « nourricières » (*feeding droplets*). Durant la période d'incubation, les gouttes nourricières libèrent des composés chimiques dans le milieu qui sont captés par les gouttes efficaces, ce qui assure leur propre croissance. Sans s'en rendre compte, Wen et ses collègues impliqués dans la conception de l'expérience, ont en quelques sortes réinventé une technique de culture cellulaire adaptée à des protocellules dont les besoins se ressemblent. Au début des années 1950, il était encore difficile pour les scientifiques de comprendre quels composés précis étaient nécessaires pour la croissance cellulaire. Cependant, le concept de « milieu intérieur » hérité de Claude Bernard¹¹ leur était bien sûr familier. Il s'agit du milieu, à l'intérieur de l'organisme, qui enveloppe les organes et les tissus dans un environnement stable propice à leur maintien et développement. Depuis

¹ <https://www.cnrtl.fr/definition/incubation>, 27/07/2021 ^{xvii} Voir partie 4.1 pour plus d'explication sur les terminologies employées et leur évolution dans le temps.

l'acceptation paradigmatique de la théorie cellulaire du vivant au début du XX^{ème} siècle,¹² il est envisagé que les cellules, qui composent les tissus, doivent aussi être préservées dans un milieu intérieur pour qu'elles puissent être maintenues en vie et se développer. C'est suite à cette réflexion que Puck et Marcus mettent en place en 1955 une nouvelle méthode pour maintenir une culture cellulaire *in vitro* dans des conditions propices à leur développement.¹³ Sur un piédestal, ils déposent des cellules destinées à être cultivées, et dessous, ils déposent un tapis de cellules irradiées aux rayons X et ne pouvant donc plus croître ni se diviser. Dans cette configuration les cellules irradiées diffusent des composés propices au développement des cellules cultivées, sans se reproduire et donc sans rentrer en compétition avec elles pour l'espace et les ressources. Il en va exactement de même pour les gouttes nourricières et efficaces de Wen où la première population incapable de croissance apporte les composés nécessaires pour le développement de la seconde. Comme cellules et protocellules ont ici des besoins similaires, ces deux protocoles développés indépendamment sont en quelque sorte une convergence évolutive technologique, pour des objets vivants et protovivants aux besoins comparables.

Wen a fini l'installation de son expérience. Il se dirige en vitesse dans la salle voisine, et s'assied à son bureau devant son écran où il peut garder un œil sur les gouttes en pleine incubation affichées à son écran. Cette pièce, généralement appelée le « grand bureau », est le plus grand open-space du laboratoire. Deux longues tables accrochées aux murs opposés se font face, et quatre étagères soutiennent un amas de cartons et pièces de machines en tous genres. Huit ordinateurs sont alignés sur les tables, avec deux écrans chacun, à intervalle régulier et huit chaises sont disposées plus aléatoirement. Ces chaises à roulettes ne sont rarement deux fois dans la même disposition au cours d'une journée. Les chercheurs installés dans cette pièce, doctorants ou post-doctorants, sont presque tous expérimentateurs et sont donc la plupart du temps en train de manipuler dans une autre pièce. À chaque instant, il y a une poignée de chaises vacantes qui est réarrangée de diverses manières au gré des discussions et réunions informelles qui se font et défont à longueur de journée. Cette configuration donne à ce bureau une réputation ambiguë : il est l'un des endroits les plus conviviaux du laboratoire, mais de ce fait il est aussi le plus bruyant et le moins propice à la concentration.¹ Car de la concentration, il en faut. Non seulement pour Wen qui, imperturbable, surveille à distance ses gouttes en incubation, mais aussi pour tous les autres chercheurs qui analysent leurs résultats, lisent la littérature scientifique, mettent à jour leurs diaporamas de présentation et écrivent leurs articles.

Brad, un doctorant canadien, se lève de sa chaise et frappe à la porte de l'autre côté du couloir. Une voix lui dit d'entrer, c'est celle de Philippe, maître de conférences et co-directeur de la thèse de Brad.

« Je viens juste pour récupérer une feuille que j'ai imprimée.

¹ La fréquence des conversations qui s'y tient est de plus un avantage notable pour un doctorant tentant une ethnographie de son propre laboratoire. Il n'est donc pas surprenant que j'aie choisi de déménager dans cette pièce dès que l'occasion s'est présentée.

- Eh bien vas-y je t'en prie. Tu sais, tu n'as pas besoin de toquer pour chercher des documents. Comme c'est la salle de l'imprimante, elle est à tout le monde. »

La « salle de l'imprimante » reste néanmoins le bureau de Philippe, qu'il partage avec un autre chercheur et un ingénieur, rarement présents. Malgré ses remarques régulières, rares sont ceux qui rentrent dans son bureau sans frapper. La pièce est sobre, Philippe est assis face à une table qui ne soutient qu'un simple ordinateur portable. Une étagère à sa gauche est remplie d'une vingtaine de livres traitant essentiellement de la physique des systèmes biologiques et des réseaux. Derrière, lui un tableau blanc porte encore les marques de réflexions et de réunions passées : lettres grecs, équations mathématiques, cubes et triangles témoignent du degré d'abstraction atteint dans cette pièce. Une porte fermée sépare le bureau de Philippe de celui d'Andrew juste à côté. D'origine britannique, il est professeur, chef du laboratoire et dispose d'un bureau personnel, encore plus sobre que celui de Philippe.¹ Enfin, les trois autres pièces de ce côté du couloir sont toutes des bureaux contenant six places chacun, les portes constamment ouvertes, et occupés par des membres non permanents du laboratoire, essentiellement doctorants et post-doctorants.

Andrew sort de son bureau, salue un doctorant dans le couloir et rentre dans la grande salle de manipulation en face, communément appelée le « big lab ». Il ouvre le robinet audessus d'un évier près de la porte pour se laver les mains, et de là il regarde une partie de son équipe à l'œuvre. Réparties sur trois grandes paillasse, sept personnes manipulent des pipettes ou des machines. Une personne est assise dans un coin face à une hotte individuelle, dont la vitre ne laisse à peine rentrer les bras. Elle pipette des solutions et jette régulièrement des tubes dans une poubelle jaune flanquée du célèbre symbole international mettant en garde contre les déchets à risque biologique. Cet espace est uniquement réservé aux manipulations de bactéries. Mais ces précautions ne sont pas vraiment prises pour protéger le personnel de risques d'infection, car les bactéries utilisées sont réputés inoffensives pour l'être humain. Il s'agit surtout de protéger les autres manipulations expérimentales de ces microbes qui peuvent contaminer de nombreux échantillons. Les chercheurs du LBC sont particulièrement craintifs de telles contaminations dont il est très difficile de se débarrasser et qui peuvent ruiner des mois entiers d'expérience. Les plus craintifs d'entre eux sont sans nul doute ceux travaillant sur l'ARN, car leurs molécules sont particulièrement sensibles à la dégradation bactérienne. La paillasse réservée à ces travaux se trouve d'ailleurs dans le coin à l'exact opposé de la hotte bactérienne. Cet espace est identifiable par les multiples étiquettes collées sur la paillasse, les machines et les tiroirs. Praveen et Samuel, un postdoctorant indien et un doctorant français en charge de nombreuses expériences du projet Startevo, font attention à leurs moindres faits et gestes, et sont très méfiants de leur voisinage. Avant chaque manipulation, ils aspergent leur surface de travail, leurs machines et leurs ustensiles d'un désinfectant dont ils ont un stock entier rangé sous leur paillasse dans un carton. Les mains gantées en toute circonstance, ils changent de gants dès qu'ils touchent une surface étrangère à leur paillasse.

¹ À eux deux, Philippe et Andrew sont les chercheurs permanents les plus impliqués dans l'équipe, et encadrent de près ou de loin la plupart des membres.

Une extrémité de cette même surface est réservée pour la préparation des solutions du projet Chemfit. Contrairement au projet Startevo, les conditions chimiques des solutions sont si rudes qu'aucun être vivant ne pourrait les contaminer. Leandro, un stagiaire de Wen d'origine angolaise, pipette dans des tubes à cette paillasse. Lui aussi porte des gants, mais contrairement à la plupart des autres chercheurs, il s'agit plus de se protéger que de protéger ses solutions. Durant cette phase de préparation, il n'a pas besoin de faire attention à ses moindres faits et gestes comme ses voisins. Il prend un feutre sur la paillasse à ARN pour écrire sur ces tubes, et Samuel lui lance un regard contrarié : « Euh... Tu viens de changer de gants avant ? » Leandro lui répond que non. Le doctorant lui explique alors que tout ce qui est sur la paillasse à ARN est exclusivement réservé à leurs travaux. Si jamais il ne peut pas faire autrement, il peut quand même utiliser très occasionnellement du matériel sur cette paillasse, mais en prenant soin de changer de gants avant de ne toucher à quoi que ce soit. Le stagiaire s'excuse et lui assure que cela ne se reproduira plus. Même s'ils sont amplifiés par la nature des deux projets concernés, ces conflits de territoires sont réguliers dans le big lab.

De façon générale le personnel s'accorde pour dire que le LBC est surpeuplé, et cela se ressent particulièrement dans cette pièce incontournable. Chaque expérimentateur a une surface de paillasse attitrée, mais il arrive souvent que plusieurs d'entre eux doivent s'alterner pour un même espace de travail. D'autre part, les machines nécessitent une réservation à l'avance, sur une feuille de papier ou sur un logiciel commun au laboratoire. Il n'est cependant pas rare que des écarts à la règle génèrent des tensions sur la gestion du temps en plus de celle sur l'espace. Malgré les difficultés expérimentales, et quelques tensions, l'ambiance dans cette pièce reste globalement décontractée comme dans l'ensemble du laboratoire. Cette pièce est principalement un lieu de manipulation, et on interprète les résultats générés plus volontiers dans le couloir, les bureaux ou encore la cuisine. Le big lab n'est par ailleurs pas un lieu de compartimentation, comme la salle microfluidique, mais de mise en œuvre et d'analyse de réactions chimiques comme pour ce qui sert de « métabolisme » aux protocellules microfluidiques.

Praveen rentre dans la pièce et appelle Samuel qui le rejoint. Un cale porte en plastique est inséré dans la charnière de la porte d'entrée pour la maintenir ouverte, ce qui facilite les allées et venues avec les mains chargées. Avant de partir avec Samuel, il la retire et ferme la porte. Les courants d'air passant par l'ouverture favorisent le dépôt de germe et donc augmentent le risque de contamination des précieuses solutions d'ARN. Ils se dirigent tous les deux vers la pièce voisine, communément appelé le « small lab », et Praveen montre au doctorant une photo de gel sur un écran (voir partie 3.1). Cette pièce est aussi une salle de manipulation mais plus petite que le big lab, comme son nom l'indique. Contrairement à la salle précédente où l'on voit des personnes avec des gants bleu clair avec des blouses blanches, nous voyons ici trois personnes avec des gants violets, deux en blouses bleues et une en blouse verte en train de manipuler. Ce code couleur indique une délimitation de l'espace encore plus visible que dans la pièce précédente. La salle est dédiée à deux activités : la fabrication et la visualisation de gels d'une part, et la fabrication et le traitement de puces microfluidiques d'autre part. Les chercheurs sont tenus de porter une blouse bleue en pratiquant la première activité et une blouse verte pour la seconde. Le traitement de surface des puces nécessite l'utilisation d'un produit toxique, et la visualisation des gels requiert des colorants catégorisés comme CMR (substances

cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques). Le port de blouses différentes est conçu pour minimiser les risques de contaminations croisées pour la santé du personnel. Il est par ailleurs interdit de sortir de la pièce avec les gants violets qui doivent être jetés dans des poubelles spécifiques. Monique, ingénieure d'étude, est responsable du respect des consignes de sécurité et n'hésite pas à rappeler à l'ordre les éventuels écarts. De nouveau, des étiquettes et des écriteaux signalent la spécificité des espaces. La paillasse pour la coloration des gels est parsemée d'étiquettes avec le symbole « CMR » et la paillasse réservée aux gels d'ARN est décorée de nombreux écriteaux pour délimiter le territoire, comme « RNA don't touch » ou « no Prot ». Le dernier fait référence aux utilisateurs de la paillasse voisine qui travaillent sur les protéines et dont les manipulations sont particulièrement à risque pour l'intégrité des ARN.

« Très bien, j'avoue, tu avais raison. Bravo ! » En visualisant la photo du gel à l'écran, Samuel au départ sceptique, félicite Praveen qui vient de débloquent une situation complexe. « Tu vois ! Allez, ça mérite bien une pause-café » répond Praveen. Tous les deux sortent de la pièce et se dirigent vers la cuisine juste à côté. « Sérieusement ? Oh non... » La porte de la cuisine est fermée. De l'autre côté de la porte, on distingue plusieurs voix dont celles de Philippe et Andrew qui occupent cette salle qui sert de cuisine, de salle de repos et de salle de réunion. Une réunion vient donc apparemment de commencer, et d'expérience toute l'équipe sait quand les réunions débutent mais jamais quand elles se terminent. Praveen et Samuel hésitent, discutent à voix basse, et finalement toquent à la porte, rentrent doucement et se préparent un café au fond de la pièce le plus discrètement possible. Philippe, Andrew, August un doctorant néerlandais, et deux collaborateurs d'un autre laboratoire sont assis sur des chaises en plastique autour de la table qui occupe plus de la moitié de l'espace. À côté de l'évier et du réfrigérateur, un grand tableau blanc est couvert de schémas et d'équations mathématiques. Sur les tables sont disposés des carnets, un ordinateur portable, une tablette, de l'huile, du sel et différentes sauces. August, dont la thèse est codirigée par Philippe, travaille sur des aspects physico-chimiques théoriques liés à l'origine de la vie. L'objet de la présente discussion est de réfléchir à la façon d'interpréter les résultats expérimentaux des protocellules que Wen a présentés dans une réunion précédente. Plus largement les scientifiques autour de la table discutent des propriétés émergentes qu'un système de réactions chimiques doit présenter pour qu'il initie une évolution darwinienne. Pour eux, ce serait une étape décisive de transition de l'inerte au vivant. Un collaborateur se lève, pointe du doigt une équation différentielle inscrite au tableau :

« C'est simple, pour que le système devienne vivant, il suffit que la dérivée de cette formule s'annule en deux points.

- En effet, mais notre système chimique ne le permet pas et je ne sais pas s'il en existe un qui pourrait présenter les propriétés nécessaires dont nous avons discutées. » répond Alex.

Son interlocuteur se rassoit, fronce les sourcils et réfléchit. Dans cette pièce le vivant se conçoit mathématiquement, mais la contrainte de la réalité matérielle n'est jamais bien loin. Praveen et Samuel repartent de la pièce aussi discrètement qu'ils sont entrés et lancent un « bon courage ».

Le tour des locaux du laboratoire de biochimie de l'ESPCI s'arrête ici. La répartition des activités et des discussions selon les pièces nous a déjà donné un aperçu du phénomène de stabilisation de faits scientifiques. Un exemple de parcours matériel, informationnel et spatial peut prendre la forme suivante. Des ARN sont mis à réagir ensemble dans le big lab (fabrication matérielle d'un phénomène). Dans le small lab, le système expérimental est transformé en un signal de taches sombres sur un gel (fabrication d'un signal brut de résultats). Dans un bureau, ce signal brut est analysé quantitativement sur ordinateur et intégré à d'autres résultats. Dans la cuisine, les différentes interprétations sont confrontées et une délibération opère. Enfin, dans le couloir les énoncés scientifiques stabilisés sont exposés sur un poster. Dans son ethnographie de laboratoire,¹⁴ Bruno Latour établit six types d'énoncés à propos de faits scientifiques qu'il entend régulièrement de la part des chercheurs. Du moins stabilisé au plus stabilisé, ils s'échelonnent de la façon suivante :

Type 1 : énoncé spéculatif, conjecture ou spéculation.

Type 2 : affirmation circonstancielle.

Type 3 : énoncé se fondant sur un autre énoncé, c'est-à-dire un énoncé présentant des modalités (« une modalité désigne tout énoncé qui a trait à un autre énoncé »).

Type 4 : énoncé faisant partie du savoir communément accepté.

Type 5 : énoncé relatif à un fait pris comme acquis.

Type 6 : fait tellement établi qu'il est implicite à tout énoncé et jamais explicité tel quel.

Au LBC, ce type de transformation d'un type d'énoncé vers un autre peut être corrélé à la pièce dans laquelle l'énoncé est émis. Ce phénomène a déjà été retranscrit par Nete Schwennesen dans son ethnographie d'une clinique de dépistage du syndrome de Down.¹⁵ Dans la pièce d'élaboration du diagnostic, l'information est hésitante et peut subir diverses requalifications. Mais dans la salle où se trouve le couple venu pour le dépistage du fœtus, l'information est énoncée comme objective et fiable.

Enfin nous avons vu que la gestion du territoire entre les différents chercheurs du laboratoire s'avère ne pas être une mince affaire. Pour beaucoup le LBC est « surpeuplé ». La problématique de l'espace est un problème très sérieux en recherche expérimentale et c'est d'ailleurs une des raisons qui a poussé Andrew à déménager son équipe de l'université de Strasbourg à l'ESPCI.

3.2.1.iii. Structure et fonctionnement de l'équipe

Les posters que nous avons vus dans la partie précédente exposent un échantillon des projets qui sont menés au laboratoire de biochimie. Si la plupart d'entre eux sont liés par la technologie de la microfluidique en gouttelettes appliquée à la biologie, ils se distinguent par les thématiques abordées. Les projets se regroupent principalement autour du profilage cellulaire (appliqué à

l'hétérogénéité des cellules de tumeurs cancéreuses par exemple), de l'évolution dirigée de biomolécules d'intérêt pharmaceutique ou biotechnologique (comme des anticorps ou des protéines d'intérêt pour l'industrie), de l'étude de l'évolution de réseaux de régulation de gènes (appliquée à la résistance bactérienne aux antibiotiques par exemple), du diagnostic moléculaire pour diverses maladies, du développement d'outils d'analyse biotechnologique (comme le couplage entre visualisation de cellules et séquençage de leur ADN), ou encore de l'origine de la vie. Malgré quelques projets de recherche fondamentale, la plupart d'entre eux sont destinés à des applications pratiques et sont élaborés en étroite collaboration avec des industriels pharmaceutiques ou biotechnologiques.

La composition humaine de l'équipe et la culture qui se montre est typique d'un laboratoire ouvert sur l'international. Comme remarqué par Sophie Houdart, lors de son ethnographie d'un laboratoire japonais de génétique du développement,¹⁶ le laboratoire se donne à voir comme « une culture sans culture », et la diversité des nationalités qui sont représentées participerait à cet idéal d'acculturation chère à l'universalisme scientifique. Le laboratoire est composé pour moitié de non français et l'anglais fait office de lingua franca bien que seulement deux ou trois membres soient anglophones natifs. Il ne s'agit cependant pas d'un anglais britannique ou américain, mais d'un anglais très simple et relativement approximatif. Il est souvent qualifié « d'anglais de laboratoire » car le vocabulaire y est réduit au minimum et les accents de chacun sont manifestes. L'essentiel est de se faire comprendre : un vocabulaire trop riche et les tournures littéraires sont proscrits. Ainsi les anglophones eux-mêmes doivent s'adapter à cette utilisation élémentaire de leur propre langue pour être compris par l'équipe. La maîtrise de l'anglais est variable entre les chercheurs mais son utilisation obligatoire ne constitue pas ici un handicap, comme cela peut l'être dans d'autres laboratoires.¹ Le personnel français parle spontanément anglais en présence de non-francophones, même si plusieurs de ces derniers prennent des cours de français. Et lorsque les francophones discutent entre eux, l'abondance d'anglicismes dans leur vocabulaire témoigne du degré de familiarité qu'ils ont avec l'anglais.

Ce multiculturalisme manifeste pourrait laisser penser que le groupe qui constitue le LBC est une mosaïque de cultures sans cohérence particulière. Cependant, les membres du LBC partagent bel et bien un ensemble cohérent de références relatives à l'institution de la recherche (culture académique), à un champ de connaissances (culture épistémique) et à l'utilisation de techniques (culture technologique). Ils représentent une trentaine d'individus occupant divers postes : stagiaires, doctorants, postdoctorants, chercheurs permanents (comprenant un chargé de recherche, un maître de conférences et un professeur), ingénieurs et gestionnaires. Bien qu'ayant parfois des objectifs divergents, ils ont tous intérêt à faire fonctionner l'équipe de façon cohérente. Nous allons voir dans cette partie comment cette équipe perdure de façon cohérente, malgré des tensions imputables notamment aux postes de chacun, en développant principalement les points suivants : l'argent, la publication et la technologie.

¹ Sophie Houdart montre par exemple dans son ethnographie que l'anglais est source de tensions et de frustrations chez les chercheurs japonais qui le maîtrisent mal.¹⁶ Plus généralement, l'hégémonie de l'anglais dans l'univers académique s'avère être une source de discrimination envers les non-anglophones tout le long de leur carrière.^{88,89}

Le rapport aux financements, permettant le fonctionnement de l'ensemble des projets du laboratoire, révèle les contrastes existants entre les différents postes. Les jeunes chercheurs¹ ont par exemple carte blanche pour commander eux-mêmes l'ensemble des réactifs et des consommables dont ils ont besoin pour leur recherche. La seule contrainte est de référer les descriptions de chaque achat, avec leur prix, dans un tableur en ligne accessible à tous les membres du laboratoire. Aucune contrainte ne leur est communiquée, hormis de faire confiance à leur propre jugement sur le bien-fondé de ces achats. Même s'ils doivent demander la permission d'un chercheur permanent (principalement Philippe ou Andrew) pour des achats de plus de 1 000 €, leur demande est systématiquement accordée avec peu, voire pas, de discussion. Malgré cette liberté, ce sont les jeunes chercheurs eux-mêmes qui sont les plus soucieux de l'argent qu'ils dépensent, si bien qu'il leur arrive même de synthétiser les composés recherchés par soucis d'économie. Cependant, Andrew est très clair et incite les chercheurs à suivre les conseils qu'il a lui-même reçus dans son passé : « si quelque chose que tu comptes fabriquer au laboratoire est commercialisable, achète-le et ne perds pas de temps, car ton temps aussi a un prix ». Cette décision n'est pas toujours facile pour les jeunes chercheurs, surtout lorsqu'ils maîtrisent la production et la purification de protéines dont les prix sont souvent jugés exorbitants. Cette difficulté peut s'expliquer par deux éléments. Le premier est la précarité à laquelle plusieurs sont confrontés (entre autres à cause d'un salaire relativement faible et du prix du loyer à Paris), ce qui peut induire un comportement économe. Le second est leur ignorance totale des comptes du laboratoire qu'ils ponctionnent pour leurs achats. Malgré les encouragements de Philippe et d'Andrew, ils manifestent régulièrement la peur d'être trop dépensiers, surtout pour les plus jeunes d'entre eux.

Les chercheurs permanents (et les gestionnaires) sont beaucoup plus au courant des stocks financiers dont le laboratoire dispose pour la bonne et simple raison qu'ils écrivent eux-mêmes les demandes de financement. Malgré les succès qu'ils rencontrent, Philippe et Andrew sont extrêmement critiques vis à vis des financements des projets sur l'origine de la vie qu'ils estiment particulièrement difficiles à obtenir, par rapport à la plupart des autres projets du laboratoire. Même s'ils ont réussi à obtenir des financements publics sur ces sujets, en accentuant fortement les potentiels impacts technologiques, la stratégie de financement pour l'origine de la vie se démarque. En effet, la plupart des financements des projets du laboratoire provient des industriels qui y trouvent leur compte dans le développement technologique qui en résulte. Les liens étroits qu'Andrew a tissés avec des firmes pharmaceutiques et biotechnologiques permettent une rentrée d'argent suffisante pour que les jeunes chercheurs n'aient pas en principe à trop se préoccuper d'argent. Mais les projets fondamentaux sur l'origine de la vie n'intéressent pas les industriels de par l'absence de retour sur investissement.

Le peu de financement industriel ou public motive les chercheurs de l'origine de la vie à se tourner vers des fondations établies par de riches mécènes ayant acquis le goût pour des questions dites « existentielles ». Les plus connues d'entre elles sont sans nul doute la Simon's

¹ Cette catégorie regroupe les doctorants et postdoctorants, de 23 et 40 ans, qui composent plus des deux tiers de l'équipe et sont tous expérimentateurs. Ils ne restent généralement que 3 à 4 ans induisant de ce fait un taux de renouvellement important de l'équipe.

Foundation et la John Templeton Foundation. La dernière a pour objectif affiché d'apporter des réponses aux « grandes questions », que ce soit sur la vie, l'univers ou la conscience, mais elle se distingue dans le paysage scientifique par un lien fort avec les églises protestantes conservatrices états-uniennes.¹⁷ Elle finance notamment des projets de recherche visant à faire converger science et religion, jusqu'à subventionner une étude clinique pour tester l'efficacité de la prière.¹⁸ Plus inhabituel encore, la fondation finance activement des programmes de recherche ouvertement créationnistes.¹ Pourquoi une institution sensible au discours créationniste finance-t-elle des recherches scientifiques sur l'origine de la vie ? Comme le fait remarquer Christine Hauskeller dans son évaluation critique de la recherche sur les protocellules,¹⁹ les créationnistes peuvent instrumentaliser les recherches sur l'origine de la vie, et plus particulièrement celles sur la fabrication de cellules artificielles, quel qu'en soient les résultats. En effet si les projets échouent, cela pourrait signifier l'impossibilité de reproduire ce qui est vu comme le miracle de la création ; et au contraire si ces derniers sont réussis, cela pourrait montrer la nécessité d'un concepteur intelligent pour faire émerger la vie, casquette qu'endosserait un dieu créateur dans le discours créationniste. Les chercheurs du domaine qui bénéficient de ces financements ne sont pas dupes, et n'oublent pas dans les remerciements à la fin de leurs articles une déclaration d'indépendance, comme : « opinions expressed in this publication are those of the authors and do not necessarily reflect the views of Templeton World Charity Foundation » dans un article dont Philippe est coauteur.²⁰ Andrew n'a jamais eu affaire à cette fondation mais sait reconnaître les opportunités auprès de riches mécènes, à l'instar de Jonathan Rothberg, scientifique millionnaire et entrepreneur américain qu'il a rencontré en personne et duquel il a obtenu des financements pour le projet Chemfit (voir chapitre 4).

La recherche de financements et la gestion de l'argent est emblématique du partage des tâches entre jeunes chercheurs et chercheurs permanents, mais elle s'insère dans une répartition du travail plus large. Ce sont les permanents qui, lors de l'écriture des demandes de financement, dessinent les grandes lignes des projets à venir, que les jeunes chercheurs exécutent en y apportant ou non des changements. Et ce sont enfin les permanents qui conçoivent le plus les narrations retranscrites dans les publications scientifiques, à partir des résultats et analyses des plus jeunes. Si non-permanents et permanents ont tous intérêt à produire et publier des résultats robustes et impactant dans les meilleures revues possibles, des besoins divergents relatifs à leur poste respectif peuvent entraîner des tensions. Les postdoctorants, en particulier, ne sont au laboratoire que pour une courte durée et doivent rentabiliser au maximum leur passage au laboratoire en publiant le plus d'articles de qualité en un minimum de temps. Ces articles sont la clef pour constituer un CV solide et sortir de la précarité ressentie du postdoctorat. Ce sont aussi eux, avec les doctorants, qui exécutent les expériences souvent harassantes et dont ils veulent extraire le plus de résultats publiables. Cependant, la publication d'un article dans un journal à comité de lecture n'est plus un facteur limitant aujourd'hui. En effet, la prolifération des revues de faible qualité, voire des revues prédatrices, offrent une voie d'accès pour la publication du moindre résultat en échange d'une rémunération pour frais d'édition.²¹ Le

¹ Exemple du projet : « Evangelical Theology and the Doctrine of Creation » financé de 2019 à 2022, <https://www.templeton.org/grant/evangelical-theology-and-the-doctrine-of-creation> (site visité le 09/08/2021).

principal facteur limitant se situe alors au niveau de la production de résultats de qualité maximale et d'une narration suffisamment impactante pour viser un journal à comité de lecture de bonne réputation. Mais la qualité minimale des résultats obtenus est souvent interprétée différemment par les post-doctorants et les permanents. Plus le curseur de la qualité est élevé, plus les postdoctorants doivent dépenser de temps et de l'énergie pour faire les expériences et les analyser, alors même que leur contrat est à durée déterminée. De l'autre côté, les chercheurs permanents ont généralement beaucoup moins de raison de se préoccuper du temps. Au sein d'une équipe qui fonctionne bien, leur nom est déjà associé à une part importante des articles issus de l'équipe. Ainsi, leur intérêt en vue d'obtenir d'autres financements, et de progresser dans leur carrière, est généralement de publier dans les revues à plus fort facteur d'impact, idéalement *Science* ou *Nature*. Cette divergence est à la source de négociations, dans lesquelles les postdoctorants poussent à la publication, en vantant les travaux déjà réalisés, et les permanents tentent de convaincre que la prolongation de leur effort leur ouvrirait les portes des plus grands journaux.

Parmi les autres intérêts divergents, figure celle de la gestion de l'espace comme explicité dans la partie précédente. Sur ce point la relation entre Monique l'ingénieur d'études et Praveen, postdoctorant sur l'ARN, est représentatif des tensions qui peuvent en découler :

« De toute façon c'est simple, Praveen ne m'écoute jamais. J'ai beau lui expliquer encore et encore il me répond 'oui oui' et n'en fait qu'à sa tête » confie Monique à un doctorant. De son côté Praveen, qui explique au jeune chercheur les tenants et aboutissants du maniement de l'ARN à la paillasse lui dit : « Tu vois, derrière ce meuble, sous la paillasse, je stocke toutes les solutions pour faire les gels. Elles sont cachées exprès, et ne dis à personne où elles sont. Je t'assure que c'est dans ton intérêt d'éviter que quiconque ne pose la main dessus pour éviter la moindre contamination. C'est ton projet, tu en es responsable, et tu seras le seul à subir les conséquences négatives du comportement des autres en cas de problème. Méfie-toi surtout de Monique. Tu vas voir, elle va constamment te demander de ranger tes solutions dans le stock commun. Dis 'oui' mais ne l'écoute pas, tu n'as aucun intérêt à prendre un tel risque. » Praveen et Monique sont très lucides sur cette situation. Même sans effet apparent, l'ingénieure continue à faire des remarques à Praveen car tel est son rôle dans le laboratoire : faire en sorte que les règles de sécurité et de stockage des produits chimiques soient respectées. De son côté le postdoctorant connaît les produits qu'il utilise et est convaincu de deux choses : ils ne présentent pas de danger pour les autres membres du personnel, mais les autres membres présentent un réel danger pour les produits, du fait des contaminations.

Malgré les quelques tensions et négociations qui adviennent de temps à autre, le laboratoire de biochimie est une équipe soudée et l'entraide est la norme. Les jeunes chercheurs demandent régulièrement des conseils pour les expériences et analyses qu'ils mènent. Certains étant spécialisés dans une technique, leur aide peut être particulièrement bénéfique à celui qui la sollicite pour apprendre cette expertise ou en bénéficier. La plupart des projets menés au laboratoire sont fortement interdisciplinaires et nécessitent de nombreuses compétences qu'une même personne ne peut que rarement maîtriser parfaitement en même temps. Il peut s'agir de

sujets liés à la chimie, la biochimie, la biologie (moléculaire, cellulaire ou structurale), la physique des matériaux, la microfluidique, les statistiques, les algorithmes informatiques, une très bonne maîtrise de l'anglais ou du français, ou bien encore la maîtrise de tel ou tel logiciel ou machine. Les expertises des chercheurs sont plurielles et les rôles d'expert et de bénéficiaire de l'expertise peuvent s'inverser entre deux mêmes individus. Si l'aide est vraiment conséquente pour la poursuite du projet du bénéficiaire, il peut arriver que ce dernier propose à l'expert de figurer parmi les coauteurs de la publication à venir, ce qui a généralement pour effet immédiat d'augmenter sa motivation. Toutefois cette promesse de figurer dans la liste d'auteurs n'est généralement pas nécessaire pour bénéficier de l'aide des collègues. Apporter son aide est une manière de maximiser ses chances d'en recevoir une à l'avenir, même si la sympathie que des chercheurs peuvent éprouver pour certains de leurs collègues explique aussi en grande partie ce comportement. Ces échanges se concrétisent particulièrement dans le transfert de protocoles qui constituent des enjeux fondamentaux en recherche expérimentale. En effet, une importante partie du temps des jeunes chercheurs est consacrée à la mise au point de ces protocoles expérimentaux adaptés au mieux à leurs besoins circonstanciés. Une fois établis, ils sont l'aboutissement de semaines de travail intenses et ont de ce fait une importante valeur d'échange au sein de l'équipe. Ces derniers, consignés sous la forme d'une marche à suivre, voire d'une recette sur des tableurs ou des fichiers de traitement de texte, épargnent temps et énergie à ceux qui les reçoivent.

La plupart des chercheurs considèrent néanmoins qu'ils manquent cruellement de temps pour mener à bien leurs différentes activités, ce qui limite nécessairement l'aide que chacun peut apporter. Marie, une doctorante en fin de parcours, confie par exemple, comme un conseil, qu'une de ses plus grandes erreurs aura été de consacrer trop de temps aux autres au détriment de ses propres projets. Malgré tout, même si le groupe est composé d'individus dont la plupart possède ses propres objectifs, un maillage d'entraides le structure. Et un sentiment d'appartenance à une véritable équipe est manifeste, notamment de par la fréquence des activités de loisirs partagées en dehors des heures de travail.

Le système d'échange d'aide et de protocoles est par ailleurs maintenu par le cycle régulier des séminaires internes hebdomadaires. Chaque lundi de 13h à 14h, deux jeunes chercheurs exposent l'un après l'autre l'avancée de leurs expériences et analyses devant les autres chercheurs de l'équipe dans un petit amphithéâtre. C'est l'occasion pour les présentateurs de parler des problèmes techniques auxquels ils sont confrontés, et de demander conseil à l'assemblée. La très grande majorité des cas, une main se lève et quelqu'un explique quelle molécule ou quel protocole pourrait l'aider dans sa requête. Souvent la conversation technique est interrompue par le chercheur qui a pris la parole pour lui proposer une discussion plus en profondeur à la suite du séminaire. Les présentations suivent un schéma classique chez l'ensemble des chercheurs. Les deux ou trois premières diapositives expliquent le contexte de la recherche, les applications sur le long terme puis l'objectif précis du projet. Par la suite, un bref résumé des expériences et analyses déjà effectuées est passé en revue, et le gros de la présentation est dévolu aux objectifs techniques à court terme, et aux toutes dernières expériences menées et problèmes techniques rencontrés. À la fin, un temps est réservé pour

d'éventuelles questions ou remarques. La quasi-totalité des discussions sont relatives à des considérations expérimentales et techniques. En effet, le bien fondé de telle ou telle expérience pour soutenir l'objectif de recherche du présentateur n'est jamais discuté, pas plus que les interprétations conceptuelles qui sont faites de l'analyse des résultats. La raison principale est que l'équipe n'est pas tournée vers une thématique particulière, mais spécialisée dans le développement et l'utilisation d'une technologie : la compartimentation de biomolécules et de cellules en microfluidique en gouttelettes. De ce fait le laboratoire développe des projets de façon opportuniste, en fonction des besoins ressentis d'acteurs extérieurs pour explorer des thématiques aussi éloignées que la résistance bactérienne aux antibiotiques ou le diagnostic de cancers. C'est ainsi grâce à cette spécialisation technologique particulière qu'a été introduite la thématique de l'origine de la vie, à la suite des sollicitations d'un théoricien désireux de tester expérimentalement ses théories sur l'abiogenèse (voir partie 3.2.1.v).

La connaissance et l'usage des technologies du laboratoire constituent le véritable ciment qui lie les jeunes chercheurs entre eux. Ainsi, qu'un projet d'origine de la vie ou de diagnostic de cancer soit présenté en séminaire, les attentions seront toutes tournées sur les protocoles utilisés. Il en résulte donc que les jeunes chercheurs qui fabriquent les protovies sont d'abord des femmes et des hommes d'action avant d'être des partisans de telle ou telle théorie sur l'origine de la vie. Ce constat découle aussi de la répartition manifeste des tâches au laboratoire. Ce sont surtout les chercheurs permanents qui identifient les théories et les concepts à tester expérimentalement. Dans la plupart des cas, les jeunes chercheurs acceptent les prémices générales de ces derniers sans véritablement chercher à les remettre en cause, même si ce constat s'amenuise au fur et à mesure de l'avancée de la carrière. De façon remarquable, Wen et Praveen (affectés respectivement à la construction de protovies sous la forme de protocellules microfluidiques, et de réseaux d'ARN) n'ont jamais parlé entre eux de sujets relatifs à l'origine ou à la nature de la vie. Bien qu'ils aient des opinions sur la question, elles s'effacent derrière la prépondérance de la technologie dans leur quotidien. Ce n'est par ailleurs pas non plus avec les chercheurs d'autres projets que Wen et Praveen pourraient avoir ce genre de discussions. En effet, ils sont tournés vers des applications concrètes en médecine ou en biotechnologies et plusieurs d'entre eux ne comprennent même pas l'intérêt des expériences de Wen et Praveen. « Mais qu'est-ce qu'il fout Wen, avec ces gouttes de formose ? », « Alors moi cette histoire de ribozymes, ça me passe, mais alors là, complètement au-dessus de la tête » sont des phrases qu'on entend et qui manifestent une incompréhension palpable face à ce type de projets. Les chercheurs qui tiennent ces propos ne comprennent non seulement pas l'intérêt du but à long terme, mais manifestent surtout leur incompréhension face à l'interprétation des résultats de processus physico-chimiques en processus vitaux. Ce travail interprétatif n'est effectivement pas intuitif pour nombre de jeunes chercheurs du laboratoire (voir partie 3.2.2.ii) et émane en grande partie des chercheurs permanents.

Andrew et Philippe sont donc les principaux garants des concepts qui sont appliqués, voire générés, au laboratoire. Pour reprendre l'analyse de Bruno Latour,²² ces derniers s'ajoutent au collectif d'entités humaines et non humaines dont ils ont la charge et qui est composé par l'ensemble des membres de l'équipe, mais aussi par les artefacts produits, les résultats, les articles, les start-ups et les collaborations avec industriels et autres chercheurs. Philippe et

Andrew doivent maintenir les interactions entre tous les membres du collectif, qui ont chacun leur propre dynamique, pour assurer la continuité de leur cycle de crédibilité présenté dans la figure 4. La crédibilité d'Andrew et Philippe, à travers celle du laboratoire de biochimie de l'ESPCI, s'est construite sur un savoir-faire technologique d'études et de manipulations du vivant, ou de fragments du vivant, dans des gouttes d'eau. Ces manipulations sont à l'origine de l'ensemble des objets non-humains vivants et protovivants, incontournables dans le réseau qui constitue le laboratoire, et qui génèrent les résultats à interpréter.

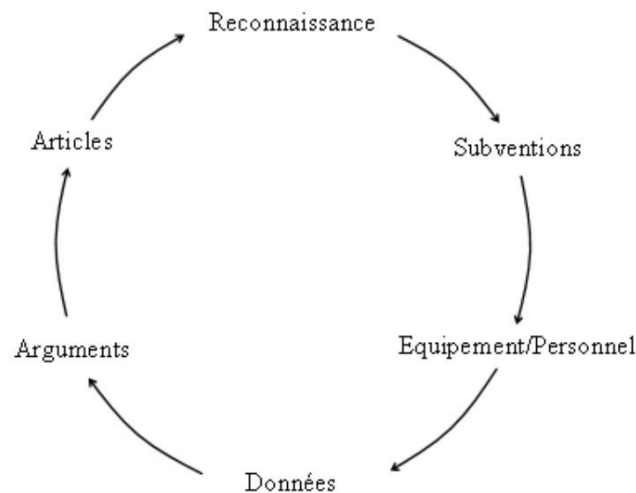


Figure 4. Cycle de crédibilité des chercheurs (permanents). Repris de ²².

3.2.1.iv. Objets vivants, hybrides et protovivants

Les acteurs matériels non humains du laboratoire se répartissent entre le totalement vivant et le totalement inerte. Dans cette partie nous échantillons les objets utilisés par les chercheurs selon qu'ils sont vivants, hybrides (association de fragments d'êtres vivants et d'objets inertes) ou protovivants, qui sont associés à des opérations d'analyse ou de synthèse.

Les objets vivants non humains du laboratoire sont les cultures de cellules animales, humaines ou bactériennes dont il faut protéger l'état et maintenir une prolifération adaptée, en prenant soin d'elles et en les nourrissant convenablement. Elles sont utilisées dans des démarches d'analyse, dans le sens où elles sont isolées en différentes parties pour l'étude de phénomènes particuliers. Matériellement, cela se manifeste par la mise en évidence ou l'extraction physique de ses parties. Dans le premier cas des molécules fluorescentes peuvent être ajoutées dans les cellules pour marquer des phénomènes particuliers visibles au microscope sous la forme de lumière rouge ou verte. Dans le second, les cellules sont explosées (par choc osmotique) et seules certaines de leurs biomolécules sont récupérées pour les étudier. L'ensemble de ces cellules sont soit issues de cultures cellulaires réalisées par les chercheurs précédents, soit achetées à des fournisseurs extérieurs. Pour l'achat, les chercheurs feuilletent des catalogues sur lesquels sont référencées de nombreuses lignées cellulaires aux caractéristiques variées et issues de multiples modifications génétiques. Une autre partie du catalogue est dédiée aux solutions nutritives,

souvent extraites d'organismes vivants, nécessaires pour les maintenir en vie selon leur type. De façon tout à fait banale, les scientifiques achètent ainsi des cellules allant de cellules de souris « humanisées »¹ à des cellules humaines issues de cellules cancéreuses d'une femme depuis longtemps décédée,^{xxiv} avec du sérum de cheval ou de veau fœtal.

D'autres projets n'utilisent aucune cellule, mais seulement des biomolécules (fragments d'êtres vivants) que les chercheurs attachent ou insèrent dans des milieux inertes comme les puces microfluidiques. Les artefacts qui en résultent sont des objets hybrides présentant des processus vitaux (comme la transcription d'ADN en ARN, ou la traduction d'ARN en protéines) enchevêtrés dans des processus techniques (comme des stimuli électriques d'électrodes ou des courants de fluides générés par une pompe). Les chercheurs fabriquent par exemple des billes d'hydrogel microscopiques tapissées de fragments d'ADN et des gouttes d'eau microfluidiques comportant des systèmes moléculaires d'ADN, d'ARN et de protéines. Un des projets qui fabrique ce type d'artefacts hybrides vise à mettre au point une ADN-polymérase (protéine permettant de répliquer l'ADN) plus efficace que les autres polymérases du marché, afin de servir d'outil technologique pour nombre de laboratoires et industries. Intégralement financé par une entreprise de biotechnologies états-unienne, l'objectif est alors de faire subir une évolution dirigée à une polymérase préexistante, de telle façon que ses capacités soient améliorées, et surtout que sa séquence soit suffisamment éloignée de la polymérase d'origine pour contourner un brevet qui y est associée. Cette transformation de biomolécules acquière donc sa signification dans un cadre institutionnel commercial et juridique. De façon matérielle, le système expérimental est un ensemble de molécules se répliquant dans des compartiments. De ce fait, il ressemble à certaines protovies du laboratoire constitué aussi de molécules se répliquant dans des gouttes d'eau. Mais la différence ontologique entre ces deux types d'artefacts se situe au niveau du cadre interprétatif dans lequel ils prennent sens. En effet, contrairement aux artefacts hybrides qui sont exclusivement interprétés sous un angle technologique, les protovies sont aux yeux des chercheurs qui les produisent et les analysent des prototypes d'êtres-vivants, des êtres vivants en devenir, bien que la préoccupation technologique soit constante chez les expérimentateurs. Les objets hybrides et les protovies se distinguent des cellules vivantes du laboratoire, car si elles sont analysées par moments, elles procèdent d'abord d'une synthèse. Cette synthèse est effective autant sur le plan matériel qu'épistémique : les artefacts en question sont construits à partir d'éléments matériels de base, et la connaissance qui en est tirée se construit du simple au complexe (c'est-à-dire partir de la connaissance des comportements individuels des éléments constitutionnels pour établir la connaissance des dynamiques du système dans sa globalité). De ce fait, les seuls projets du laboratoire ou la vie en tant que

¹ Dans le milieu de la biologie cellulaire, les cellules animales sont dites « humanisées » lorsqu'elles expriment des antigènes humains à la suite d'une modification génétique. Le caractère « humain » de ces protéines n'est établi que par la connaissance a posteriori de la séquence protéique naturellement présente chez l'être humain. En effet, aucune propriété essentielle a priori ne pourrait différencier une protéine humaine d'une protéine non humaine.
^{xxiv} Il est question ici de la lignée cellulaire HeLa, issue de la biopsie d'une patiente américaine atteinte d'un cancer du col de l'utérus, et décédée en 1951, Henrietta Lacks. Cette femme afroaméricaine dont les cellules ont été récupérées sans son consentement, est devenu un symbole de la lutte pour les reconnaissances des droits des minorités.90

concept est étudiée (les projets de protovies) sont donc des projets à dominante synthétique et non analytique. Ainsi, la vie au laboratoire de biochimie ne s'analyse pas, elle se synthétise.

Le collectif d'acteurs non humains du laboratoire est enfin complété par l'ensemble des objets non vivants dont les plus importants sont les machines (machines à PCR, blocs d'incubation, centrifugeuses, vortex, microscopes, compteurs de cellules, ordinateurs etc.) sans lesquelles les chercheurs sont incapables de mener à bien leurs expériences et analyses. Ces dernières sont propres à la plupart des laboratoires de sciences expérimentales. Mais ce réseau d'entités vivantes, hybrides ou protovivantes semble être une caractéristique du LBC qui tranche, au moins, avec les autres laboratoires de l'Ecole. La partie suivante nous permet de comprendre comment les protovies ont historiquement acquis leur place au sein du laboratoire.

3.2.1.v. Historique : d'objets hybrides à objets protovivants

« In the best case, the project would lead to the creation of what could be termed - with all the care such a claim requires - a form of "artificial life" in the laboratory ». Cette phrase est extraite de la description du projet ChemFit, rédigé en 2016 par Andrew, Philippe et 3 autres collaborateurs pour une demande de financement. Comment en sont-ils arrivés à concevoir cette fabrication du vivant au laboratoire de biochimie de l'ESPCI ? En prenant le parcours d'Andrew comme fil conducteur, nous montrons dans cette partie que les articles et les demandes de financements de projets montrent l'évolution de l'interprétation d'objets techniques en objets protovivants, à travers un flou ontologique.

a) Développement technologique de biomolécules compartimentées

1985, université de Leicester. Andrew, natif du pays de Galles et fasciné par les mécanismes de la biologie débute son doctorat. Son sujet porte sur le découpage d'ARN par des protéines, pour comprendre l'épissage, qui correspond à une étape fondamentale du transfert d'information dans les cellules. À cette époque l'étude de l'ARN était un « hot topic » qui concentrait « les étoiles de la biologie moléculaire » pour reprendre les termes d'Andrew. En effet, les découvertes de mécanismes moléculaires de l'ARN ne cessent de faire les unes de journaux tels que *Nature* ou *Science*. En particulier, la découverte des propriétés catalytiques de l'ARN²³ constitue une véritable révolution conceptuelle dans les théories sur la biologie moléculaire. Autrefois considérée seulement comme une molécule porteuse d'information, l'ARN devient tout à coup capable d'accélérer des réactions chimiques au même titre que les protéines. Dans la vague de la théorie du « monde à ARN »,²⁴ qui propose ce polymère comme molécule primordiale de l'origine de la vie, l'ARN occupe alors une place centrale dans les esprits d'Andrew et de ses collaborateurs.

Ce n'est cependant pas la matière qui compose l'ARN qui passionne le plus Andrew mais les processus évolutifs associés, et plus particulièrement ceux liés à l'évolution darwinienne (à

savoir la rencontre des propriétés de reproduction avec hérédité, de variation, et de sélection).²⁵ Pour le jeune chercheur, si percer les mystères de la nature est passionnant en soi, le réel enjeu est de les maîtriser pour un développement technologique au service de l'homme. En 1991, il obtient un poste de post-doctorant au laboratoire de Greg Winter au MRC Laboratory of Molecular Biology à Cambridge (UK), centre de recherche considéré comme le fleuron international de la biologie moléculaire. Il participe aux toutes premières élaborations de systèmes d'évolution in vitro d'anticorps humains à portée thérapeutique et il est impliqué dans la création des entreprises Cambridge Antibody Technology et Novartis (rachetés plus tard par les groupes pharmaceutiques AstraZeneca et GSK respectivement). La technologie phare du laboratoire, qui a d'ailleurs valu le prix Nobel de chimie à Greg Winter en 2018, est le « phage display », qui est une technique d'évolution dirigée consistant à utiliser des virus de bactéries pour orienter l'évolution de biomolécules dans les directions voulues. Quelques années plus tard, Andrew forme son propre groupe de recherche au sein du même laboratoire sur la maîtrise de processus d'évolution dirigée. Si le phage display a fait ses preuves dans l'évolution d'anticorps, Andrew et son équipe rencontre de sérieuses difficultés pour l'évolution d'enzymes. Le défi principal est de maintenir un lien durant toute l'opération entre l'information génétique à l'origine des protéines, et les protéines elles-mêmes. Ces deux caractéristiques sont régulièrement nommées « génotype » et « phénotype » par les acteurs de ces recherches, en référence aux êtres vivants, qui désignent information d'une part et caractères observables, issus de cette information, d'autre part. Comme les anticorps sont des protéines qui ont la capacité de se fixer sur d'autres protéines (des antigènes), cela permet de maintenir ce fameux lien entre génotype et phénotype. Mais les enzymes, qui sont des protéines catalytiques, ne se fixent que de façon transitoire à d'autres molécules. Il faut donc trouver un moyen de maintenir phénotype et génotype ensemble.

Quelques années avant, Andrew et son équipe avaient utilisé des émulsions inverses (c'est-à-dire des gouttes d'eau dans de l'huile) pour coupler des chaînes lourdes et légères d'anticorps. Selon ses mots, il s'agit d'une simple « mayonnaise » : il suffit en effet de mélanger de l'eau avec une huile synthétique pour obtenir des gouttes d'eau en suspension dans cette huile. Ces émulsions font l'objet d'études physiques depuis au moins les années 1950, mais leur couplage avec la biologie moléculaire constitue une innovation récente. Andrew et ses collaborateurs décident d'utiliser ces émulsions pour former des compartiments et donc constituer le fameux lien entre phénotypes et génotypes si difficile à maintenir pour l'évolution des protéines. L'aboutissement de ce projet se concrétise par la publication en 1998 d'un article intitulé « Manmade cell-like compartments for molecular evolution » dans *Nature Biotechnology*.²⁶ D'office le titre interpelle. Il y a la volonté de montrer la fabrication artificielle d'un objet comparable au vivant. Le premier paragraphe de l'article témoigne de l'importance que revêt le compartiment pour permettre l'évolution darwinienne des êtres vivants, voire pour l'origine de la vie. Le deuxième paragraphe met en avant les impasses technologiques qui empêchent de maintenir le lien entre génotype et phénotype dans les systèmes d'évolution in vitro d'enzymes déjà connus. Et enfin, le troisième propose d'appliquer ce qu'on observe dans la nature au système artificiel d'évolution, c'est-à-dire un compartiment à l'instar de la membrane cellulaire.

La structure de l'argument est donc d'apparence biomimétique : une impasse technologique est comblée par le mimétisme d'un processus naturel. Cependant, il a été montré que dans la plupart

des cas, les technologies dites biomimétiques ne prennent cette étiquette qu'après la découverte ultérieure d'une analogie entre une technologie préexistante et un processus naturel.²⁷ Andrew considère aujourd'hui que le rôle de la technologie préexistante des émulsions inverses d'une part, et le rôle de l'observation de processus naturels d'autre part, ont tous les deux contribué en concert à cette innovation, même s'il n'hésite pas à qualifier ce projet de biomimétique. Par ailleurs, l'origine de la vie est brièvement mentionnée dans l'introduction pour appuyer l'importance du rôle que la compartimentation aurait pu y jouer pour maintenir ensemble génotype et phénotype. Mais contrairement aux protocellules du projet Chemfit, ces protocellules-ci n'ont pas vocation à éclairer un chemin de transition de l'inerte au vivant. Ainsi, il n'y a pas de volonté de fabriquer un système qui pourra évoluer vers un être vivant. Il n'y a pas d'acquisition de nouvelles propriétés vitales, autres que celles implémentées par les expérimentateurs. De ce fait ces protocellules sont des artefacts hybrides tels que décrits dans la partie précédente, mais pas des protovies, mêmes si elles en sont à la marge.

L'évolution de biomolécules a beau passionner Andrew, elle est pour autant loin d'être sa seule préoccupation. En effet, il est un homme marié. Sa femme Catherine, française originaire de Strasbourg, effectue depuis quelques années des recherches en Angleterre sur les mécanismes moléculaires de l'ARN. Son poste à l'INSERM lui permet de mener à bien ses travaux à l'étranger pour quelques années. Mais en 2003, une fois cette période dépassée, Catherine est face à un dilemme : soit elle reste auprès de son mari en Angleterre et quitte son poste, soit elle retourne à Strasbourg (son lieu d'affectation) et vit éloignée de lui. Finalement, une autre décision est prise. Andrew décroche un poste de professeur à l'université Louis Pasteur de Strasbourg et y transfère en 2004 la quasi-totalité de son équipe pour former le « Laboratoire de biologie chimique ». Vie professionnelle et vie personnelle peuvent de nouveau cohabiter. Ce déménagement ne constitue pas un sacrifice professionnel pour autant. L'université de Strasbourg est très réputée en biochimie, et plus particulièrement l'Institut de Science d'Ingénierie Supramoléculaires tout juste fondé par Jean-Marie Lehn, prix Nobel de chimie de 1987, auquel Andrew est maintenant rattaché.

Au moment du déménagement, Andrew est en train de terminer de corédiger un article de recherche. À sa parution en 2005 dans la revue *PNAS*, il est intitulé : « Selection of ribozymes that catalyze multiple-turnover Diels-Alder cycloadditions by using in vitro compartmentalization »²⁸. De même que pour l'article de 1998 sur les « man-made cell-like compartments », il s'agit d'évolution dirigée de biomolécules. Toutefois un pas est franchi car les expériences décrites montrent la sélection d'enzymes ARN (i.e. ribozymes) et non d'enzymes protéiques qui constituent les substrats habituels dans le domaine. Les ARN sélectionnés à l'aide de gouttes d'eau dans de l'huile, à la mode « mayonnaise » comme précédemment, acquièrent la capacité de joindre des molécules entre elles par une réaction chimique spécifique. Ce résultat ajoute non seulement une pierre à l'édifice de l'hypothèse du monde à ARN sur l'origine de la vie mais aussi à l'ambition de synthétiser des cellules artificielles. Pourtant l'article ne mentionne à aucun moment les applications pour ces domaines. L'introduction et la discussion ne portent exclusivement que sur des considérations technologiques, et les mêmes « cell-like compartments » de 1998 deviennent ici des « *in vitro* compartments ». Encore une fois, nous avons affaire à des artefacts hybrides mais non protovivants. Le papier est cité 130 fois, et

le premier article y faisant référence pour une considération d'abiogenèse n'apparaît qu'à la 40^{ème} position sur le site Google Scholar.¹ Ceci s'explique par la taille réduite de la communauté de chercheurs sur l'étude de l'origine de la vie par rapport à l'engouement des scientifiques et des financeurs pour le développement biotechnologique aux applications toujours grandissantes. L'article faisant référence à l'étude d'Andrew est une revue de littérature au nom sans ambiguïté : « Darwinian chemistry: Towards the synthesis of a simple cell ».²⁹ L'auteur correspondant est Philipp Holliger,^{xxvi} biologiste moléculaire au MRC Laboratory of Molecular Biology, qui figure parmi les plus grands noms de la recherche contemporaine sur l'origine de la vie. Son laboratoire de rattachement n'est par ailleurs pas anecdotique. Il a en effet effectué sa thèse dans le même groupe de recherche qu'Andrew lors de son post-doc. Alors qu'il se trouvait dans une impasse technologique pour son projet, Philipp a pris connaissance des travaux d'Andrew consignés dans l'article de 1998, ce qui a permis de débloquent sa situation. Cette nouvelle méthode de sélection de biomolécules dans des gouttes d'eau dans de l'huile, à savoir l'utilisation intelligente d'une « simple mayonnaise », a été déterminante dans la carrière de Philipp. Il a effectivement tout de suite compris l'immense potentiel de ce genre de techniques pour la synthèse de la vie en laboratoire, entreprise dans laquelle il est impliquée jusqu'à ce jour.

L'expression de « mayonnaise » pour désigner les émulsions qu'Andrew utilise surprend tant elle était éloignée de ce à quoi on pourrait s'attendre pour une innovation biotechnologique de premier plan. Mais le protocole pour mettre en place ces compartiments n'est pas bien plus difficile que celui pour faire une mayonnaise. Il s'agit de mélanger vivement une matière grasse et une matière aqueuse pour en faire une émulsion. Cette expression aux accents d'artisanat est aussi à replacer dans le contexte d'une autre technologie d'émulsion, beaucoup plus sophistiquée cette fois-ci : la microfluidique en gouttelettes. Depuis le début des années 2000, une équipe de physiciens de la matière molle, dirigée par David Weitz à Harvard, met au point des procédés pour générer des gouttes d'eau en émulsion dans des canaux microscopiques gravés dans des puces de quelques centimètres.³⁰ La production et la manipulation de ces gouttes d'eau deviennent de plus en plus précises et il n'échappe pas à Andrew que cette technologie pourrait décupler le potentiel de ces expériences. Lors d'une conférence au MIT, Andrew présente ces derniers résultats avec David Weitz assis dans l'auditoire, ainsi que d'autres experts du domaine. Andrew en a bien conscience et insiste sur les percées qui pourraient découler d'une fusion entre sa maîtrise de la biologie moléculaire en émulsion et la microfluidique en gouttelettes. Il n'en aura pas fallu plus pour convaincre David Weitz qui vient voir Andrew à la pause pour lui proposer un partenariat. Jouant sur la rivalité amicale entre Harvard et le MIT, il s'adresse à lui en ces termes : « leave these losers of the MIT behind, and come and talk to the professionals at Harvard ». Cette phrase annonce alors le début d'une coopération fructueuse, de l'importation et du développement de la microfluidique pour des applications biotechnologiques au

¹ À la date du 03/08/2021, d'après le site de référencement Google Scholar. Le classement des articles en question est effectué du plus cité au moins cité. ^{xxvi} À ne pas confondre avec Philippe Nghe du laboratoire de biochimie de l'ESPCI.

laboratoire d'Andrew. Mais cette alliance technologique n'est pas encore considérée pour la construction de véritables prototypes d'êtres vivants.

b) Passer d'artefacts hybrides à protovivants

Les premières annonces de cette fusion de compétences ne tardent pas à se propager à l'international, et un certain Eörs Szathmáry contacte Andrew par mail. Si Andrew ne l'a jamais vu en personne, il le connaît bien de réputation. Ce théoricien hongrois de la biologie de l'évolution est l'auteur d'un livre de référence: « The major transitions in evolution », ³¹ et d'un livre dont le titre parle de lui-même « The Origins of Life », ³² tous les deux coécrits avec un pont de la théorie de l'évolution du XXème siècle John Maynard Smith. Considéré comme la figure de proue des aspects théoriques de l'origine de la vie, ¹ Eörs a traduit en anglais « The principles of Life » de Tibor Gánti dans lequel il expose son modèle du Chemoton présenté comme la modélisation « de la plus simple 'machine' chimique qui montre les caractéristiques de la vie généralement établies ». ³³ Eörs se considère comme profondément influencé par les travaux de Gánti ³⁴ bien que ce dernier juge les propriétés de reproduction et d'évolution comme des critères de vie potentiels (par opposition à des critères de vie absolus).

Eörs ne remet pas en cause le fait que le Chemoton est une bonne approximation d'un système vivant à l'échelle individuelle, mais il consacre l'essentiel de ses travaux à l'étude de l'évolution qui est nécessaire au maintien de la vie à l'échelle de la population. Par opposition à la notion « d'unité de vie », il considère que les « unités d'évolution », aussi simple que de petites molécules, sont la clef de l'origine de la vie. ³⁵

Dans cet esprit, Eörs a développé un modèle mathématique censé fournir quelques explications concernant le passage de petites molécules répliquatives à des cellules : le modèle de correction stochastique (abrégé SCM en anglais). ³⁶ Il peut se résumer de la façon suivante. Des réplicateurs sont présents dans des compartiments. Ces réplicateurs peuvent correspondre à des ARN ou toute autre molécule capable de produire des copies d'elle-même ou d'une autre molécule, et les compartiments peuvent être des vésicules. Le tout forme une protocellule pouvant se diviser. La réplication n'étant pas parfaite, elle peut engendrer des molécules légèrement différentes des réplicateurs originaux, et ce de façon stochastique (i.e. par hasard). Pour que le système répliquatif soit stable, il faut qu'une proportion minimale de molécules répliquées participe d'une manière ou d'une autre au processus de réplication du système. Certaines variations dans le processus de réplication génèrent des molécules différentes qui ne participent pas à la réplication mais continuent de se faire répliquer. De plus, les propriétés de certains variants font qu'ils sont encore plus rapidement répliqués que les réplicateurs. ³⁷ Ils sont alors considérés comme des « parasites » dont l'excès peut mener le système à sa perte. Le SCM prévoit que d'une manière ou d'une autre, une sélection naturelle élimine les compartiments qui concentrent trop de parasites. Par conséquent, les autres compartiments (avec peu de parasites) génèrent une population plus importante de protocellules, par division, et le système répliquatif dans son ensemble peut se maintenir dans le temps. Ce modèle explique donc théoriquement

¹ Il est désigné comme « la figure de proue de la théorie de l'origine de la vie » par Sijbren Otto, un chercheur influent des études de l'origine de la vie, lors du webinaire de l'Origins Center des Pays-Bas. Diffusion en vidéo sur le site Youtube, le 4 février 2021 : <https://www.youtube.com/watch?v=0P7Bhw64S2A>.

comment des mécanismes de sélection peuvent prévenir la disparition d'un système répliatif malgré des variations stochastiques (voir chapitre 6 pour plus de détails). Sur le papier, les équations d'Eörs fonctionnent, mais aucune expérience n'a été menée pour tester son modèle : il a besoin de validation expérimentale pour confirmer matériellement ce dont il est intimement convaincu. C'est pour cette raison qu'il contacte Andrew dont la compétence en biologie moléculaire et en microfluidique en gouttelettes répond parfaitement à ses besoins.

« C'est toujours le problème pour les théoriciens, de ne pas trouver de façon de tester ses hypothèses. C'est pareil en physique avec la théorie des cordes par exemple. (...) Pour Eörs, cette collaboration c'est un peu comme... Enfin il ne dit pas ça comme ça, mais c'est un peu commencer à faire de la vraie science. C'est-à-dire qu'on crée une hypothèse et on la teste » confie Andrew.

Andrew a connaissance des recherches sur l'origine de la vie. Il a connu l'effervescence autour de l'hypothèse du monde à ARN et était encore au MRC Laboratory of Molecular Biology lorsque Philipp Holliger fonde son équipe dont le but majeur est, encore à ce jour, la fabrication d'un ribozyme autorépliatant, ce qui constitue un véritable « graal » des études de l'origine de la vie. Andrew avait déjà pointé la ressemblance de certains de ses systèmes expérimentaux avec les « premiers êtres vivants » supposés²⁶ mais il n'avait pas plus creusé le sujet que cela. L'abiogenèse n'a jamais été le but de ses expériences. Il faut dire que le domaine de recherche de l'origine de la vie peut paraître ingrat. La faible taille de la communauté ne permet qu'un faible nombre de citations et les financements sont rares. Mais Eörs est déterminé à faire valider expérimentalement ses théories. Il convainc ainsi assez facilement Andrew, curieux par nature, de le rejoindre pour écrire une demande de financement, avec cinq autres scientifiques, pour un projet soumis en 2007 dont il sera le principal porteur.

La description du projet est plus large que le test expérimental d'une théorie sur l'origine de la vie et annonce d'emblée la construction d'une véritable « machine à évolution ». Comme il est d'usage pour les demandes de financement, le ton est hyperbolique avec des promesses de percées scientifiques et technologiques. Le fil conducteur du projet, intitulé eFlux (pour « Evolutionary Microfluidics »), est la mise en place d'un système intégré de microfluidique en gouttelettes permettant la génération, la sélection et la multiplication de compartiments pour l'évolution suivie de molécules ou même de bactéries. La question de l'origine de la vie est abordée mais n'apparaît pas comme centrale. Le descriptif du projet commence comme ceci :

« Ever since the insightful suggestion of John von Neumann, self-reproducing automata are considered to be a main long-term goal of IT. Biologists are dealing with such systems that arose in the course of evolution by natural selection. The future realization of technological artefacts that will mimic, or be inspired by biological automata, will face many problems that biological evolution had to solve. »

Les automates cellulaires sont des objets mathématiques et informatiques composés de parties dont les états évoluent au cours du temps. Ils sont spécifiquement créés et étudiés dans le domaine de la vie artificielle dont l'objectif est d'implémenter des propriétés vitales dans ce type d'objets sur ordinateur. Le « jeu de la vie », dont la première version est élaborée par John

Conway en 1970,³⁸ est un exemple d'automates cellulaires sous la forme de poignées de pixels dont le développement continue jusqu'à ce jour.^{39,40} La communauté scientifique qui anime l'étude sur la vie artificielle est essentiellement composée de chercheurs en informatique.⁴¹ Bien que l'évolution soit au cœur du sujet, il semble que cette communauté peine à attirer les biologistes plus concernés par la vie telle qu'elle est, et qui proviennent d'une culture épistémique éloignée.¹ De ce fait les premières lignes du projet d'Eörs et d'Andrew ont de quoi surprendre, sachant leurs parcours consacrés à l'étude du monde biologique. Dans les deux premières phrases de l'extrait cité, les automates cellulaires sont d'emblée considérés comme une référence commune auxquels les systèmes biologiques sont comparés. Cependant la phrase qui suit inverse le mouvement en parlant d'artefacts technologiques qui seraient inspirés de systèmes biologiques vus comme des automates et même désignés plus loin comme des « living ICT » (pour Information and Communication Technology). Ce passage est symptomatique d'une imbrication entre naturel et artificiel, entre processus vitaux et processus techniques. Les systèmes biologiques sont ici compris grâce aux réalisations technologiques, et ces dernières apparaissent comme conçues en s'inspirant des premiers. Par ailleurs, les artefacts technologiques que le projet ambitionne de produire sont décrits comme des approximations d'automates fluides capables d'évolution, en référence aux travaux théoriques de Ganti qu'Eörs connaît bien. Le projet explicite que « Les automates fluides sont des machines en phase fluide » et que « tous les systèmes vivants sont des automates fluides », ce qui ne laisse pas de doute ici au caractère machinique supposé des êtres vivants.²

Quel est alors le statut des objets que les chercheurs ambitionnent de construire ? Est-ce qu'il s'agit de la modélisation de systèmes vivants, de la matérialisation d'automates cellulaires informatiques, ou de la création de systèmes (partiellement) vivants, bien que non biologiques ? La suite de la description du projet témoigne de la difficulté à s'accorder sur l'ontologie de ces artefacts. L'utilisation du terme « protocellule » (85 occurrences dans le texte) en est un indicateur. Ce mot est en effet ambigu car selon les contextes il peut désigner des objets exclusivement naturels ou artificiels. Il est formé par le terme « cellule », considéré par la majorité des biologistes comme l'unité fondamentale des êtres vivants, et précédé du préfixe « proto- » qui fait référence au terme « prototype ». Ce dernier a plusieurs acceptations dont une technologique comme « premier modèle réel d'un objet, d'une machine, établi afin de le mettre au point avant d'entreprendre la fabrication en série » et une biologique de « forme primitive à laquelle on peut faire remonter les formes ultérieures ».³ L'acceptation biologique désigne donc une partie d'un être vivant qui en précède une autre au cours de l'évolution, alors que l'acceptation technologique désigne un objet artificiel intermédiaire dans le plan de réalisation d'un objet final. Pour ce qui est de la recherche sur les protocellules artificielles, l'objet final est une cellule pleinement vivante.⁴² Ce double aspect technologique et biologique est manifeste

¹ Voir « Silicon Second Nature » de Stefan Helmreich⁴¹ pour une ethnographie du Santa Fe Institute, berceau de la communauté de la vie artificielle.

² Le champ lexical des machines pour caractériser le vivant n'est principalement observé qu'en présence d'Eörs comme coauteur. Philippe et Andrew sont moins enclins à ce genre de discours (voir chapitre 4.1).

³ <https://www.cnrtl.fr/definition/prototype>. Trésors de la Langue Française ^{xxxi} Nous précisons qu'un angle technologique ne va pas nécessairement de paire avec un angle machinique.

tout le long du texte, probablement du fait des cultures épistémiques différentes d'Eörs et d'Andrew respectivement plus naturaliste et technologue.^{xxxix} Les travaux connexes d'Eörs ont eu jusqu'à présent pour objet des modélisations mathématiques de protocellules conçues comme des objets intermédiaires dans le processus historique de l'origine de la vie. Andrew, lui, ne s'est intéressé qu'à la fabrication artificielle de tels objets.

Au début de la description du projet, les gouttelettes sont « utilisées pour imiter les protocellules ». On comprend alors que les protocellules font référence à des entités naturelles qui sont ici imitées artificiellement. Il serait d'ailleurs plus juste de parler d'entités naturelles imaginées car aucune observation scientifique n'en a reporté en milieu naturel. Plus loin dans le texte, il est écrit que « une première génération de gouttelettes ("protocellules") sera créée ». Outre l'utilisation du mot « créer » à la consonance démiurgique, on note que les gouttes deviennent des « "protocellules" » entre guillemets, ce qui sous-entend une façon de parler qui ne devrait pas être pris au premier degré. Au fil du texte il est fait mention du « cycle de vie des "protocellules" » qui ont des « gènes » et des « phénotypes », et sont « "nourris" » et « "survivent" ». Ce champ lexical donne l'impression que ces entités pourraient être bel et bien vivantes. Toutefois les gouttes restent régulièrement qualifiées de « modélisation », « simulation » ou « imitation » de protocellules. À partir d'un certain moment d'ailleurs, les « "protocellules" » perdent même leurs guillemets pour devenir simplement des « protocellules », en phase avec l'acceptation technologique du terme prototype : il est proposé de construire des protocellules, et non plus d'en imiter. Sachant le fastidieux travail d'écriture d'un tel projet, dont le texte a été fortement modifié au cours des dizaines d'allers et retours entre les différents auteurs, le choix des mots n'est vraisemblablement pas anecdotique. Cependant certains termes cités, ou ponctuations (la présence de guillemets), pourraient aussi être interprétés comme des éléments de détails. Mais même si tel est le cas, cela signifie que l'ontologie des gouttes est encore floue : l'oscillation interprétative manifeste entre modèles ou instances de formes de vie ne pose pas de problème majeur aux auteurs.

Il est important de noter par ailleurs que le choix de certains mots et certaines tournures de phrases est vraisemblablement fortement influencé par la thématique de l'appel à projets à laquelle les auteurs répondent, à savoir les technologies de l'information et de la communication. Ceci contribue à expliquer le choix qui a été fait d'introduire les systèmes biologiques comme comparables à des automates cellulaires informatiques. De plus, tout le texte s'efforce de mettre en avant les entités biologiques comme étant des systèmes de traitement d'information. Andrew confie que cet effort pour rentrer dans la thématique d'un appel d'offre qui n'a, à première vue rien à voir avec le projet de recherche envisagé, est symptomatique des projets sur l'origine de la vie pour lesquels très peu de financement sont alloués. Il est alors courant de capitaliser sur des ressemblances ou des débouchés technologiques éventuels même si cela n'est pas l'objectif réel du projet de recherche dans la tête des scientifiques.

De longs mois après la soumission du projet, l'annonce du financement tombe et la collaboration entre Eörs et Andrew pour la fabrication et l'analyse des protocellules peut commencer. Andrew confie les expériences à Tadashi, un post-doctorant japonais spécialisé dans la biochimie de l'ARN, et qui a récemment rejoint son laboratoire pour apprendre

l'utilisation de la microfluidique en gouttelettes, pour l'évolution d'ARN. Il est convenu avec Eörs et Andrew que la priorité est de tester expérimentalement le modèle de correction stochastique (SCM) d'Eörs avec les gouttes microfluidiques. Cependant les expériences sont longues et fastidieuses, les années s'enchaînent avec très peu de résultats. L'ambitieuse « machine à évolution » s'avère être un casse-tête expérimental qui canalise toute l'énergie de Tadashi. Cela ne freine pourtant pas les ambitions d'Eörs et d'Andrew qui soumettent en 2011 une autre demande de financement auprès de l'European Research Council. Le projet affine la description et les objectifs du système expérimental de Tadashi à l'aide des résultats préliminaires, en plus de proposer des études théoriques sur l'évolution du système immunitaire et de réseaux de neurones dans le cerveau. Le texte témoigne encore d'une indétermination ontologique des artefacts envisagés qui sont tour à tour désignés comme des simulations de protocellules, des analogues de protocellules, des "protocellules" entre guillemets et des protocellules sans guillemets. Toutefois, un nouvel objectif est affiché par rapport au descriptif du projet précédent : « Here we aim for the experimental realization of an infrabiological system ». Pour Eörs, un système infrabiologique est un système chimique qui ne possède que deux des trois sous-systèmes constitutifs de ce qu'il considère être un système vivant minimal, qui sont relatifs au métabolisme, à l'information et à la compartimentation (i.e. le modèle du Chemoton de Gánti).³⁵ Il ne s'agit pas alors ici d'une modélisation d'un système infrabiologique, mais bel et bien de la fabrication d'un tel système. Il y a donc l'affirmation de l'ambition de créer un objet qui n'est pas seulement un modèle mais qui se situe lui-même quelque part entre l'inerte et le vivant. Nous avons alors affaire à une protovie.

De nouveau la description du projet d'Eörs et d'Andrew séduit le jury et un important financement sur cinq années est débloqué. Cette excellente nouvelle ne parvient cependant pas à masquer une autre réalité. Des tensions s'accroissent entre Andrew et le directeur de son institut à Starsbourg, notamment sur la gestion du laboratoire. Alors lorsqu'il apprend qu'un professeur de biochimie est recherché à l'ESPCI, il saute sur l'occasion. Beaucoup plus qu'une échappatoire, cette école a tout pour lui plaire. Elle cultive de nombreux liens avec les industriels, accompagne l'innovation et la création de start-ups, et surtout abrite un des pôles de recherche les plus importants en microfluidique. Il obtient le poste et en 2012 son laboratoire déménage à l'ESPCI et prend le nom de « Laboratoire de BioChimie ». Le LBC est né.

Un an après, Philippe rejoint l'équipe en tant que post-doctorant puis maître de conférences. Il a effectué son doctorat en microfluidique et son post-doctorat en biophysique sur l'évolution de réseaux de régulation de gènes. Désireux d'utiliser la microfluidique en gouttelettes pour étudier les mécanismes moléculaires de l'évolution biologique, il ne peut pas mieux tomber qu'au LBC. Dès son arrivée, Andrew lui expose les différents projets en cours, et celui en collaboration avec Eörs retient tout particulièrement son attention. Sa première mission consiste à interpréter les résultats expérimentaux de Tadashi qui sont en désaccord avec les modèles mathématiques élaborées par l'équipe d'Eörs. Parallèlement, les lectures et les discussions sur l'approche théorique et empirique de l'origine de la vie le fascinent. Il fait très rapidement le lien avec un article qu'il avait présenté lors d'un groupe de lecture pendant son post-doctorat précédent. Dedans étaient retranscrits des réseaux d'ARN capables de reproduction conçus comme maillons intermédiaires possibles dans l'origine de la vie. À l'époque, il s'était bien rendu

compte que lors de sa présentation, il avait l'air d'être le seul de son équipe convaincu de l'intérêt d'une telle étude. De ce fait, il n'a pas creusé le sujet plus loin.

Mais maintenant qu'il est dans un cadre favorable à ce type d'expériences, Philippe se dit qu'il pourrait tester les dynamiques évolutives de ces réseaux grâce à la microfluidique en gouttelettes. Afin d'obtenir un financement autonome, il écrit un projet de recherche dans la continuité du projet de Tadashi et en proposant d'étudier des propriétés émergentes des réseaux d'ARN. L'objectif du projet annoncé dès le début est clair : « Ce projet vise à concevoir des systèmes minimaux capables de propriétés élémentaires du vivant, notamment celles liées à l'évolution ». Et la description du système expérimental est introduit de la façon suivante : « Une telle approche pose de véritables défis expérimentaux consistant à reproduire et assembler in vitro les propriétés spécifiques du vivant ». Aucune mention de modélisation ou de simulation n'est faite hormis pour caractériser des modèles mathématiques où les dynamiques de gouttes simulant des cycles cellulaires. Mais les réseaux d'ARN à l'intérieur de ces gouttes sont bien des « systèmes minimaux capable de propriétés élémentaires du vivant ». Les actes de naissance des protovies se formalisent ainsi, jusqu'à l'annonce de la synthèse des gouttes du projet Chemfit quelques années plus tard décrites comme des « formes de vies artificielles dans le laboratoire » dans la demande de financement.

Nous avons donc vu à travers ce récit de la carrière d'Andrew, qui croise celle d'Eörs et de Philippe, que l'ontologie de systèmes artificiels mis au point au laboratoire, initialement en tant que technologies, est fluctuante. Le choix du vocabulaire utilisé dans les articles et les demandes de financement témoignent d'une telle incertitude. Les artefacts sont tour à tour des technologies aussi bien que des simulations, des modélisations, des imitations d'objets vivants ou encore des systèmes infrabiologiques, ou des formes de vie artificielles (protovies). Nous pouvons tout de même situer l'interprétation de ces artefacts comme des protovies au moment de la rencontre entre Andrew et Eörs, et sa stabilisation avec l'arrivée de Philippe. À partir de là, les réalisations expérimentales sont régulièrement décrites comme pouvant générer des propriétés vitales en tant que telles. Cette évolution des considérations face à des objets techniques très similaires montre à quel point le statut de protovie est avant tout une question d'interprétation. Cela explique comment les objets biologiques, les objets hybrides et les protovies se distinguent dans le laboratoire de biochimie de l'ESPCI malgré des matérialités très proches.

3.2.2. Les conceptions de la vie au laboratoire

3.2.2.i. Différents niveaux de conceptions de la vie

Cette partie vise à identifier les conceptions de la vie rencontrées au laboratoire à partir des observations ethnographiques et de la lecture des productions du laboratoire. Par conception, j'entends une représentation globale qui peut inclure des définitions et des théories mais qui ne

s'y restreint pas.¹ En étant attentif au langage utilisé par les chercheurs, il est apparu très nettement que deux grands niveaux de conceptions de la vie coexistent au laboratoire, et au sein des mêmes individus : des conceptions spontanées (intuitives), ou discursives (par opposition à intuitif). Les conceptions spontanées de la vie se manifestent lorsque les locuteurs donnent rhétoriquement des attributs vitaux à des objets qu'ils ne considèrent pourtant pas comme vivants lorsqu'on leur demande. Les conceptions discursives sont explicitées lorsque les individus cherchent rationnellement à définir et théoriser la vie ou des propriétés vitales.

La dichotomie entre concepts spontanés et discursifs est proche de la dichotomie entre concepts populaires et scientifiques de la vie discutée dans la référence ⁴³. Ces deux niveaux de conception peuvent aussi être reliés aux croyances implicites et explicites⁴⁴ qui mettent en évidence des croyances « constructives » et non constructives.⁴⁵ Steven Benner, un chimiste influent dans le milieu de l'origine de la vie, utilise par exemple ces notions pour montrer que les exobiologistes ne croient pas « constructivement » aux définitions et théorie de la vie qu'ils exposent, en affirmant qu'une croyance constructive est une croyance sur la base de laquelle le croyant agit véritablement.⁴⁶ Pour ce faire, il détaille les événements de la mission spatiale Viking de la NASA sur Mars en 1976. Cette mission comptait parmi ses objectifs la détection de vie sur le sol martien à l'aide de trois instruments de « détection de vie » embarqués sur le module envoyé à la surface de Mars. Ces trois instruments permettaient d'identifier la capacité d'échantillons de sol martien à oxyder des composés, à produire de l'oxygène ainsi qu'à incorporer du carbone. Aucune définition ou théorie explicites n'avaient été données par les chercheurs mais les choix des instruments de détection de vie suggèrent une place importante accordée au métabolisme (proche de celui observé dans le monde biologique) au sein de leur croyance constructive sur la vie. De façon surprenante, les trois instruments ont donné des résultats positifs, mais le consensus des experts de la NASA a rapidement statué qu'aucune vie n'avait été détectée. La raison principale avancée est qu'un autre instrument de mesure avait mesuré la composition chimique des échantillons et n'avait détecté aucun carbone réduit. Par conséquent Benner en déduit que la conception « carbonée » de la vie occupe une place plus importante que la conception métabolique dans la croyance constructive des chercheurs sur la nature de la vie.

L'exemple de la définition de la vie adoptée par la NASA (« un système chimique autoentretenu capable d'évolution darwinienne »)⁴⁷ et son incompatibilité avec des entités stériles, et donc incapables d'évolution (comme les mules qui sont pourtant généralement considérées comme vivantes) est aussi emblématique des différences entre les conceptions spontanée et discursive de la vie.² Pour les membres du laboratoire de biochimie (travaillant ou non sur l'origine de la vie), il ne fait pas de doute que les mules sont vivantes lorsqu'on leur pose la question. Au cours d'une discussion avec Brad, un biologiste qui travaille sur l'évolution de réseau génétique de bactéries au laboratoire, celui-ci confie que la mule est bien vivante car

¹ J'entends par définition d'un phénomène, un ensemble des propriétés nécessaires et suffisantes pour l'identifier ; et par théorie d'un phénomène, un ensemble de principes organisés en système permettant une compréhension de celui-ci. Pour un approfondissement de la différence entre définitions et théories appliqués à la vie, voir 91.

² Pour des réponses apportées à la question de l'appartenance d'entités stériles au sein des êtres vivants, malgré une définition de la vie qui inclut l'évolution, voir ^{33,92}.

composée de cellules qui sont les unités élémentaires de la vie. En lui demandant, selon lui, ce qui différencie une cellule vivante d'une cellule morte, et il répond qu'une cellule vivante est capable de se diviser. Comme les mules seraient majoritairement composées de cellules pouvant se diviser, alors cela justifierait que les mules soient vivantes. Mais alors un spermatozoïde, cellule motile et fonctionnelle mais incapable de se reproduire par elle-même, n'est-il pas un être vivant ? À cette question Brad affirme que le spermatozoïde ne l'est pas. Mais il précise bien que ce statut découle de la définition et refuse de se positionner sur une conception intuitive qu'il ne juge pas pertinente. Selon l'avis d'une dizaine d'autres chercheurs du laboratoire (travaillant ou non sur l'origine de la vie), interrogés sans leur demander au préalable leur conception discursive de la vie, il en ressort que tous, sauf une pour les mêmes raisons que Brad, répondent sans hésitation qu'ils considèrent les spermatozoïdes bel et bien vivants, malgré la contradiction apparente avec la définition de la NASA.¹

Nous pouvons déduire les conceptions spontanées de la vie des chercheurs du laboratoire en observant leur utilisation du champ lexical lié au vivant pour parler d'entités qui sont pourtant exclues de leurs conceptions de la vie lorsqu'elles sont explicitées par ces derniers. Par exemple, cela peut prendre la forme d'utilisations métaphoriques de vocabulaires propres au vivant qu'il est valide d'inclure ici dans l'analyse. En effet pour qu'une métaphore de vie soit valable il faut que l'entité comparée partage au moins une propriété essentielle de l'entité comparante (à savoir la vie). Par conséquent la prise en compte de ces métaphores peut nous indiquer ce que les locuteurs considèrent spontanément comme une telle propriété. Sur son étude de l'origine du fait religieux, l'anthropologue Stewart Guthrie montre la tendance généralisée des humains à interpréter des objets non vivants comme des objets vivants spécialement s'ils bougent, font du bruit ou se démarquent d'une quelque autre manière du paysage.⁴⁸ Il reprend le terme d'animisme pour qualifier ce phénomène, qui, en étude des religions, qualifie la croyance en des objets non vivants porteurs d'esprit, mais qui en psychologie englobe toutes les attitudes qui attribuent la vie à de tels objets.^{xxxv} Le laboratoire de biochimie n'échappe pas à cette observation lorsque les objets du quotidien (pipettes, instruments, composés chimiques) sont régulièrement qualifiés de « guys » et que les machines sont « mortes » lorsqu'elles cessent de fonctionner, aussi métaphorique que cela soit-il.^{xxxvi}

En étant attentif à ce type de langage nous avons pu constater que les principales propriétés qui justifient une telle attitude au laboratoire sont : le mouvement, le maintien d'une fonction ou le maintien d'une intégrité. Ces caractéristiques peuvent être associées aux différents usages métaphoriques du terme vie (en français, et *life* en anglais qui constituent les deux langues principales du laboratoire). En effet une personne peut être considérée pleine de vie si elle fait preuve vigueur et de dynamisme (association au mouvement), un atome peut avoir une certaine durée de vie (association au maintien d'une intégrité) et une photocopieuse peut être morte si elle n'est plus opérationnelle (association au maintien d'une fonction). Les deux dernières caractéristiques relatives au maintien de quelque chose dans le temps renvoient à une autre

¹ La question de la vie du spermatozoïde me semble particulièrement adéquate pour mettre en tension les conceptions spontanées et discursives de la vie. Leur motilité et leur incapacité stricte à se diviser les rend particulièrement propice à une conception spontanée de la vie qui

acceptation du terme vie comme période allant de la naissance à la mort d'un individu, par opposition à la vie biologique qui caractérise les mécanismes qui permettent à cette période d'exister. Ces deux acceptations font l'objet de termes différents en grec ancien : *zoé* et *bios*, dont la distinction est implicite chez Aristote⁴⁹ et explicitée par la suite par les philosophes Hannah Arendt⁵⁰ et Giorgio Agamben.^{51,xxxvii} L'anthropologue Didier Fassin analyse par

accorde une place importante au mouvement (voir partie suivante), en confrontation avec une conception discursive qui accorde souvent une place importante à la reproduction. Pour ces deux raisons, je n'ai pas choisi l'ovocyte, autre cellule sexuelle fonctionnelle, car il est non motile et parfois capable de division.^{xxxv} Je profite de cette considération pour préciser que lorsque je distingue objets vivants et objets non vivants sans me référer à un cadre théorique particulier, je m'inscris dans les conceptions générales issues des sciences biologiques contemporaines qui imprègnent les sociétés occidentales.

^{xxxvi} Voir chapitre 4.1 pour l'analyse d'un tel vocabulaire pour désigner protocellules microfluidiques.^{xxxvii} La signification de *bios* se retrouve dans le mot « biographie », par opposition à « biologie » bien lui aussi issu de *bios*.

exemple les influences entre *zoé* et *bios*, notamment à travers ses ethnographies au sein de populations de réfugiés et demandeurs d'asiles.⁵²

Conceptions spontanées et conceptions discursives de la vie cohabitent au quotidien dans le laboratoire où les différents contextes permettent aisément d'éviter tout quiproquo. Par exemple, des chercheurs dont l'activité principale est de faire évoluer des enzymes dans des gouttes d'eau écrivent sur leur propre carnet de laboratoire qu'elles sont « mortes » lorsqu'elles ne présentent pas d'activité, sans qu'elles ne soient pour autant considérées vivantes au même titre que des cellules. De façon remarquable, la plupart des chercheurs qui ne travaillent pas sur l'origine de la vie au LBC n'abordent pas le concept de vie de façon discursive et la plupart ignore même la définition de la NASA, qui est reprise comme définition de travail par Philippe et Andrew. En effet, à l'exception des projets d'origine de la vie, on n'interroge pas la vie dans le laboratoire, comme François Jacob le faisait déjà remarquer pour l'ensemble des laboratoires de biologie des années 1960.⁵³ Il arrive cependant, qu'à des fins pragmatiques, les chercheurs doivent savoir si leurs cellules sont vivantes ou mortes pour avancer dans leurs expériences, ce que le simple examen visuel au microscope ne permet pas de déterminer. Pour ce faire ils achètent des kits de réactifs (appelés « LIVE/DEAD Cell Imaging Kit ») et dont l'utilisation permet de marquer différemment les cellules mortes des cellules vivantes par fluorescence. La documentation de ces kits ne donne pas leur composition mais indique que la propriété discriminante est la capacité des cellules à être imperméables ou non à certains composés chimiques. Par conséquent, la propriété vitale qui permet d'attribuer la vie ou la mort à ces cellules est une compartimentation semi-perméable (voir chapitre 4.1). Dans le cadre des travaux de recherche associés, cette caractéristique semble suffisante pour différencier le non vivant du vivant. Cependant on peut supposer que de simples liposomes (compartiments membranaires vides), avec une composition chimique adaptée, pourraient ressortir vivants de ce test, malgré l'absence de toutes les autres propriétés vitales qui les rendraient réellement vivants aux yeux des chercheurs. Le test est donc avant tout pragmatique plus qu'ontologique.

Savoir à quel point un objet peut être considéré vivant ou plus précisément à quel point des processus peuvent être interprétés comme des propriétés vitales sont des questions réservées à ceux dont l'activité consiste à produire et à interpréter les protovies. Dans ce contexte précis dans le laboratoire, les scientifiques doivent isoler ce qui est proprement vivant de façon discursive. Mais les chercheurs des projets origines de la vie du laboratoire sont très prudents et pragmatiques sur leur façon d'aborder les propriétés vitales et les définitions de la vie qu'ils considèrent souvent comme heuristiques et non ontologiques. La définition de la NASA est régulièrement citée et l'évolution darwinienne occupe une place prépondérante dans leur conception discursive de la vie. Cette évolution est alors souvent associée à des propriétés qui en découlent ou qui l'accompagnent et qui sont à implémenter dans les protovies, comme l'autocatalyse, la compartimentation, la variation, la robustesse, la stochasticité ou l'hérédité. Si la définition du vivant n'est pas statuée, les chercheurs sont convaincus que les assemblages des propriétés listées permettent de synthétiser des objets dans une zone grise entre non vivant et vivant, que j'appelle ici l'espace du degré de vie.

3.2.2.ii. Culture épistémique et enculturation

Les objets étudiés et fabriqués dans les laboratoires de sciences peuvent se comprendre à l'aide de connaissances techniques. Cependant la signification que ces derniers prennent pour la communauté de chercheurs concernée est relative à leur culture épistémique.¹ Par exemple, dans son ethnographie de pratiques de chercheurs en exobiologie,⁵⁴ l'anthropologue Stéphane Helmreich montre que certains microorganismes acquièrent une signification particulière, dans la culture exobiologique, qui est d'être des analogues de vie extraterrestre supposés. Le travail d'extension du regard biologique (qui consiste à interpréter des phénomènes physico-chimiques comme pouvant être des propriétés vitales, voir chapitre 3.1) s'inscrit dans une culture épistémique particulière. Au laboratoire de biochimie, des connaissances techniques sont suffisantes pour comprendre le fonctionnement des artefacts synthétisés. Cependant, leur signification de protovies dans le contexte de la recherche sur l'origine de la vie ne s'acquiert pas avec des connaissances scientifiques mais avec l'apprentissage des codes qui structurent la culture de la recherche sur l'abiogenèse, et plus particulièrement la façon dont elle se déploie au laboratoire de biochimie de l'ESPCI.

Les jeunes chercheurs qui arrivent au laboratoire sur des projets d'origine de la vie n'ont généralement pas les codes de cette culture et doivent passer par une étape d'enculturation² plus

¹ Une culture épistémique est un ensemble de références, de comportements et de codes qui fédèrent dans un domaine d'expertise donné la manière dont les individus produisent et interprètent des résultats, et élaborent et jugent des connaissances. Pour plus de détails, voir 93,94.

² J'utilise le terme d'enculturation comme un apprentissage d'une nouvelle culture,⁹⁵ ici épistémique. D'autres usages de ce terme existent en anthropologie des sciences pour désigner l'appropriation d'un objet naturel par une culture scientifique.⁹³

ou moins longue pour se familiariser avec le travail d'extension du regard biologique, comme cela a été le cas pour Ivan lors de son arrivée en tant que post-doctorant. Le jeune chercheur, chimiste organicien de parcours, est confronté à son arrivée à deux nouvelles cultures : une relative à une nouvelle discipline, la biologie moléculaire, et une à un nouveau champ de recherche, l'étude de l'abiogenèse. La biologie moléculaire diffère fréquemment de la chimie organique par une approche phénoménologique au détriment d'une approche plus réductionniste qui influe sur la façon de produire et d'interpréter les résultats (voir partie 3.2.4). Et la recherche sur l'abiogenèse diffère de tout ce qu'Ivan a vu auparavant, par son extension du regard biologique sur le monde physico-chimique. Lors des premières réunions le chimiste ne comprend pas plusieurs termes que Philippe et d'autres utilisent. Qu'est ce qui justifie l'emploi de mots comme « nourriture », « parasite » ou « reproduction » pour des ARN qui ne font concrètement que des réactions de trans-esterification ? Après les explications, il se demande si tout cela n'est pas que du « storytelling ». Pour cause, les chercheurs du laboratoire, comme tous ceux du monde académique, sont souvent contraints d'insérer leurs résultats dans des articles sous la forme de narrations éloquentes pour viser les journaux les plus prestigieux et générer le plus de citations. Ivan aurait raison si ce type de vocabulaire était uniquement réservé aux restitutions. Mais non seulement les chercheurs l'utilisent entre eux, mais en plus, l'emploi de certains termes fortement liés au vivant disparaissent au moment des restitutions (voir chapitre 4.1 pour des exemples), ce qui laisse supposer que le storytelling n'est pas suffisant pour expliquer ce phénomène.

Malgré ce a priori, l'enculturation se fait. Ivan conçoit des séries d'expériences exploratoires sur des systèmes d'ARN (voir partie 3.2.4) dont les résultats ne cessent de le surprendre. Après moins d'un an, il parle des nouveaux phénomènes découverts à ses collègues en des termes encore jamais employés par ses collègues. Par exemple des ARN développent dorénavant des « dards » et d'autres peuvent mourir sous l'effet de « poisons ». Au fur et à mesure, Ivan intègre tous les codes de l'extension du regard biologique jusqu'à faire une présentation, après 2 ans au laboratoire, intitulée « Biological concepts implemented in self-replicating RNA systems » lors d'un cours auprès d'étudiants de master en biologie. Il décrit les principaux projets correspondants (voir partie 3.2.3) en se faisant dorénavant l'ambassadeur de cette extension du regard biologique.

La forte culture épistémique liée à la fabrication de protovies peut par ailleurs s'avérer rédhibitoire pour d'autres jeunes chercheurs. Ainsi, un biophysicien en fin de doctorat, que Philippe et deux des chercheurs de son équipe ont reçu à l'occasion de l'ouverture d'un poste de postdoctorant, n'a pas été convaincu du bienfondé de l'extension du regard biologique. Les explications des systèmes d'ARN capables de présenter certaines propriétés vitales l'ont laissé de marbre. Bien que comprenant la plupart des mécanismes physico-chimiques en jeu, il déclare « n'absolument rien comprendre » à ce qu'il considère comme des « spéculations conceptuelles ». Malgré les efforts de pédagogie des chercheurs pour leur expliquer la signification des protovies dans leur champ de recherche, le jeune chercheur décline finalement l'offre d'emploi malgré ses compétences. L'enculturation est donc ici un obstacle trop important. Philippe a l'habitude de ce type d'incompréhension, particulièrement auprès des physiciens de l'ESPCI qu'il fréquente et qui évoluent dans une culture épistémique très éloignée. Conscient de cette

difficulté, il précise alors sur l'offre de post-doctorat publié que « les candidats doivent être très motivés par l'apprentissage de techniques et de concepts nouveaux et par le travail en équipe dans un environnement interdisciplinaire. » L'apprentissage conceptuel s'avère ainsi être la clé de voûte pour concevoir et interpréter les artéfacts du laboratoire de biochimie dans le cadre de l'abiogenèse.

3.2.3. Tour d'horizon des protovies du laboratoire

3.2.3.i. Panorama

Dans cette partie, nous montrons la diversité des protovies du laboratoire de biochimie entre 2010 et 2020. Nous montrons la succession de ces protovies dans le temps puis le fonctionnement de chacune. Nous mettons en valeur les propriétés vitales incorporées par les expérimentateurs et celles acquises et maintenues par les protovies, qui permettent de différencier le « faire vivre » du « vivre ».⁵⁵ Cette distinction prend sa source dans les différents agents qui sont à l'origine des propriétés vitales des protovies : l'humain (et ses outils) d'une part, et les protovies elles-mêmes d'autre part (selon leurs délimitations). Les chercheurs des projets d'origines de la vie du laboratoire veulent mettre au point des objets capables d'évolution darwinienne partielle, et qui possèdent donc leur propre agentivité.¹ La succession des projets qui se recoupent dans le temps, est décrite dans la figure suivante.^{xli}

¹ Voir chapitre 2 pour une élaboration du rôle de l'agent sur le type de questions d'origine de la vie qui est posée. Afin de pouvoir faire émerger une évolution darwinienne, les chercheurs du LBC contraignent partiellement leur système sur l'axe de la spontanéité.^{xi} Seuls les projets qui font l'objet d'un article publié ou en cours d'écriture en 2021 sont ici référencés.

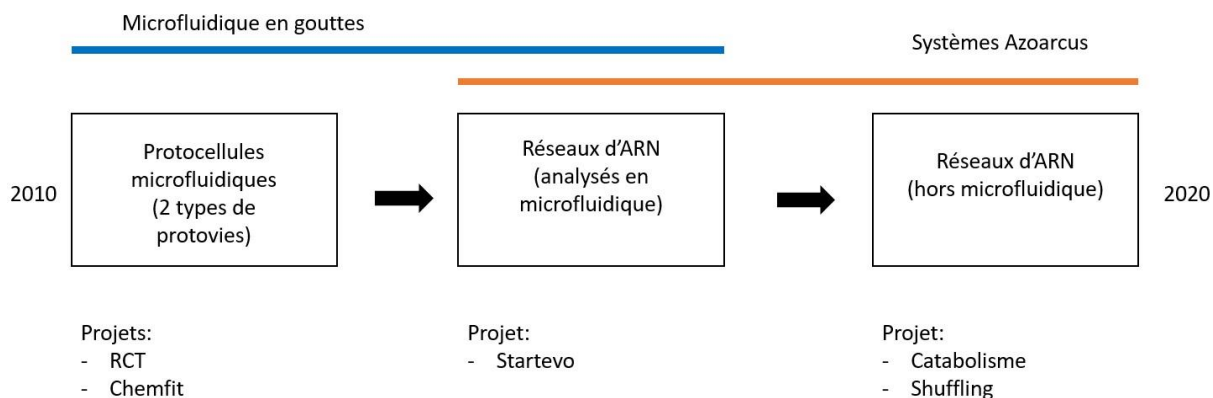


Figure 5. Représentation de la succession dans le temps des protovies du LBC. Voir partie suivante pour une rapide description individuelle de chaque projet.

Les premières protovies mises au point au laboratoire sont les répliqueurs en compartiment transitoire (RCT) suite à l'alliance théorique d'Eörs et technologique d'Andrew (voir partie 3.2.1.v). Le projet Chemfit (voir chapitre 4), aussi bâti sur des gouttes d'eau assimilées à des protocellules, est initié quelques années après le début du projet précédent. Après son arrivée au laboratoire, Philippe contribue à l'analyse théorique du projet RCT et prend en charge celle du projet Chemfit. De ce fait, l'influence théorique d'Eörs se fait moins présente. Le projet Startevo, principalement écrit par Philippe, a pour objectif d'utiliser la microfluidique en gouttelettes pour étudier les comportements de réseau d'ARNs particuliers appelés Azoarcus.¹ Si la microfluidique en gouttelettes reste central dans ce projet, son statut ontologique change vis à vis des protovies produites, car les gouttes servent ici de milliers de compartiments pour tester des milliers de réactions chimiques en haut débit. Les gouttes ne forment donc plus des protocellules mais des outils contenant des protovies. Par ailleurs, la découverte de propriétés inattendues du système Azoarcus amorce le développement d'un nouveau projet en l'absence totale de microfluidique : le projet « catabolisme ». Les réseaux d'ARN s'émancipent alors des gouttes d'eau. Par la suite et au fur et à mesure de son implication dans le laboratoire, Philippe développe de nouveaux projets d'études du système Azoarcus en dehors de gouttes, dont le projet appelé « shuffling » visant à étudier la capacité de la molécule Azoarcus à recombinaison d'autres séquences d'ARN. Philippe décide ainsi au fil des projets de s'émanciper le plus possible de la microfluidique en gouttelettes qu'il juge trop fastidieuse et non nécessaire pour atteindre ses objectifs. La microfluidique était la porte d'entrée des protovies au laboratoire de biochimie, mais Philippe les en a affranchit définitivement.

3.2.3.ii. Protocellules microfluidiques

¹ Azoarcus group I intron, de son vrai nom, est une molécule d'ARN qui a une séquence bien particulière. Les réseaux d'ARN sont constitués de différentes versions de cette séquences qui diffèrent très peu et qui sont aussi appelés Azoarcus par simplification.

a) Réplicateurs en compartiments transitoires (RCT)

Ce projet (dont la genèse est expliquée dans la partie 3.2.1.v) est à l'origine des premières entités qualifiables de protocivies au laboratoire de biochimie. L'objectif est de tester expérimentalement un modèle théorique lié à l'origine de la vie et développé par Eörs Szathmary. Il s'agit de montrer que la compartimentation permet de faire perdurer dans le temps des systèmes de répliqueurs, malgré la présence de « parasites ». La figure suivante montre en quoi consistent les protocivies générées.

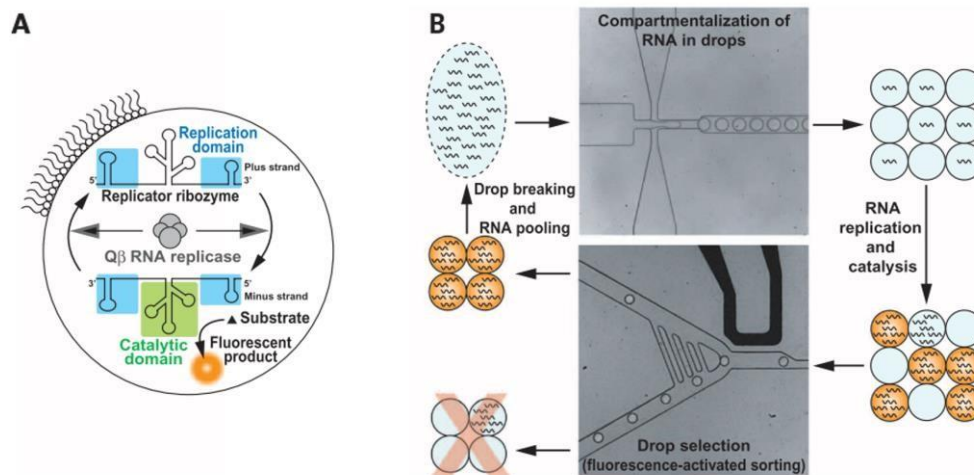


Figure 6. Schémas et photographies de répliqueurs en compartiments transitoires. A.

Schéma d'une protocellule. Une goutte d'eau dans une huile synthétique comporte en son sein plusieurs types de molécules : un ensemble de protéines, appelées « Qβ RNA replicase » qui ont la capacité de répliquer des ARN ; un ensemble de molécules, appelées substrats, dont une modification chimique peut les transformer en produits fluorescents émetteurs de lumière ; et des ARN appelés « ribozyme répliqueurs » qui sont répliqués par les protéines et qui ont la capacité de transformer les substrats en produits fluorescents. Comme la réplique n'est pas parfaite, elle peut générer des ARN qui continuent à être répliqués mais qui ne permettent pas la production de produits fluorescents. Ces derniers sont appelés parasites. **B. Cycle protocellulaire.** L'ovale en haut à gauche désigne une solution dans laquelle est mélangée une population d'ARN. L'étape suivante consiste en la compartimentation des échantillons de cette solution dans des gouttes d'eau microfluidiques. Une partie de ces gouttes d'eau contient l'ensemble des molécules décrites dans le schéma A. Dans une partie d'entre elles, les protéines répliquent correctement l'ARN ribozyme, initialement présent en petite quantité, ce qui a pour conséquence la production de produits fluorescents. Dans d'autres gouttes, les erreurs de réplique se sont accumulées de telle façon que la population d'ARN répliquée est principalement composée de parasites qui ne permettent pas la production de produits fluorescents. À un certain stade, l'expérimentateur fait passer l'ensemble des gouttes à travers une puce microfluidique qui permet de sélectionner seulement les gouttes qui présentent une fluorescence. Ces gouttes sélectionnées sont ensuite fusionnées pour former une solution d'ARN purgée d'une partie de ses parasites. Image adaptée de ⁵⁶.

Propriétés vitales incorporées par l'expérimentateur : compartiments (gouttes microfluidiques), composition (ARN et protéines encapsulés).

Propriétés vitales acquises par les protovies : réplication (les ARN sont répliqués par les protéines), variation (la réplication se fait avec erreur), phénotype sélectionné (les compartiments sont sélectionnés sur leur capacité à émettre une fluorescence).

b) Protocellules du projet Chemfit

L'objectif de ce projet est de montrer que la différence de composition chimique au sein d'une population de gouttes d'eau peut aboutir à la prolifération de certaines gouttes au détriment d'autres. Pour une description détaillée des tenants et aboutissants du projet Chemfit, voir chapitre 4. La figure suivante schématise les protovies générées et leur fonctionnement.

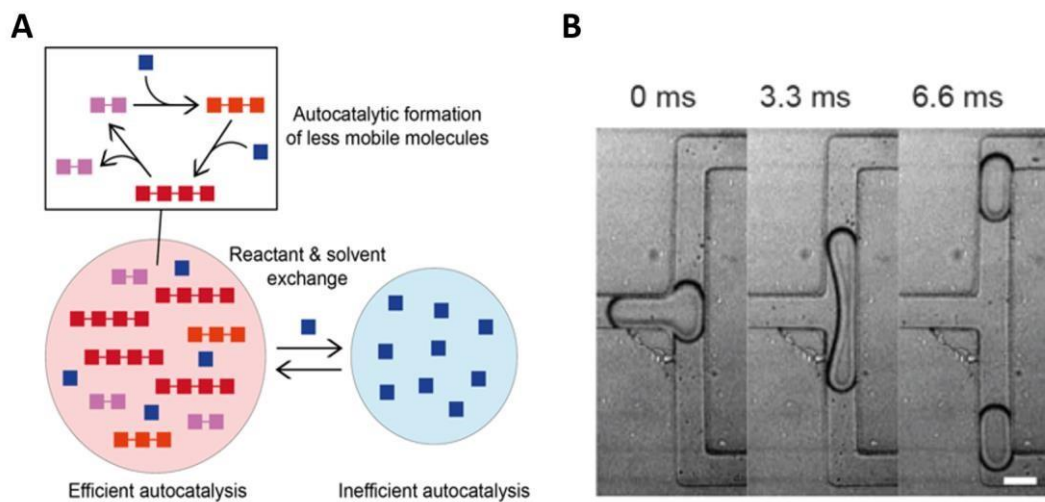


Figure 7. Schéma et photographie des protocellules du projet Chemfit. A. Schéma de protocellules. Deux types de gouttes d'eau sont présentes au début des expériences : des gouttes d'eau (en rouge sur le schéma) qui ont une composition chimique suffisante pour effectuer des réactions de réplication de glucides (par autocatalyse) ; d'autres gouttes (en bleue sur le schéma) qui ne le peuvent pas du fait du déficit en un type de molécules. Les carrés bleus désignent les plus petites molécules de glucides, qui lorsque les conditions sont réunies, s'assemblent par 2, 3 ou 4. Le cadre en haut montre un cycle de réactions qui permet la réplication d'un sucre composé de deux glucides de base, seulement dans la goutte rouge. Les réactions induisent un déséquilibre osmotique, la goutte rouge aspire les petits glucides ainsi que l'eau de la goutte bleue, ce qui implique la croissance de la première et le rapetissement de la seconde. **B. Photographie d'une division de protocellules.** L'expérimentateur fait passer les gouttes d'eau dans un circuit microfluidique. Les gouttes qui sont suffisamment grosses se divisent en deux, de telle sorte que la population des gouttes rouges grandit.

Propriétés vitales incorporées par l'expérimentateur : compartiments semi-perméables (gouttes microfluidiques), composition (glucides, cependant le pH de la solution est très différent de la vie connue), division protocellulaire.

Propriétés vitales acquises par les protovies : réplication (autocatalyse de certains glucides), croissance (certaines gouttes gonflent), phénotype sélectionné (taille des gouttes en interaction avec le circuit microfluidique), hérédité rudimentaire (maintien d'une certaine composition malgré les échanges).

3.2.3.iii. Réseaux d'ARN (Azoarcus)

a) Le système Azoarcus

Les protovies décrites dans cette partie s'appuient sur une molécule d'ARN appelée Azoarcus qui a été modifiée pour mettre en place des réseaux d'ARN se répliquant.¹ Philippe, qui a importé ce type de système au laboratoire, s'est inspiré des travaux du chercheur étatsunien Niles Lehman. Depuis les années 2000, ce dernier a montré qu'Azoarcus peut : synthétiser un autre ARN fonctionnel,⁵⁷ émerger par l'auto-assemblage de fragments plus petit pour former un complexe fonctionnel,⁵⁸ relier d'autres fragments entre eux pour former une copie de lui-même (reproduction), et reproduire ce phénomène dans des réseaux où différentes versions d'Azoarcus se synthétisent les unes les autres (réseau collectivement autocatalytiques).⁵⁹ Ces recherches s'inscrivent dans l'hypothèse du « monde à ARN » qui donne un rôle primordial à l'ARN ayant pu précéder l'ADN et les protéines, car il est capable comme ces derniers de stocker de l'information génétique et d'accélérer des réactions chimiques.⁶⁰

¹ Cet ARN accélère des réactions chimiques, il s'agit donc d'un catalyseur (*catalyst* en anglais) tout comme les enzymes protéiques. Les ARN catalyseurs sont communément appelés ribozymes. ^{xliv} L'étymologie du nom Azoarcus est ironique au regard de la place centrale que la molécule occupe dans la fabrication de protovies. La première partie « Azo- » provient du nom « azote » et la seconde « -arcus » se réfère au nom latin « arcus » qui signifie « arc ». Ces deux racines caractérisent la capacité des bactéries de types Azoarcus à métaboliser l'azote atmosphérique, ainsi que leur morphologie en forme de baguettes légèrement incurvées.⁹⁶ Il se trouve que l'origine du terme azote provient de l'association du « a » privatif suivi d'un dérivé de « zôtikos » qui signifie « vital » en grec ancien.⁹⁷ La naissance de ce mot provient des premières expériences qui ont permis d'identifier l'azote comme un élément chimique et dont le gaz a la

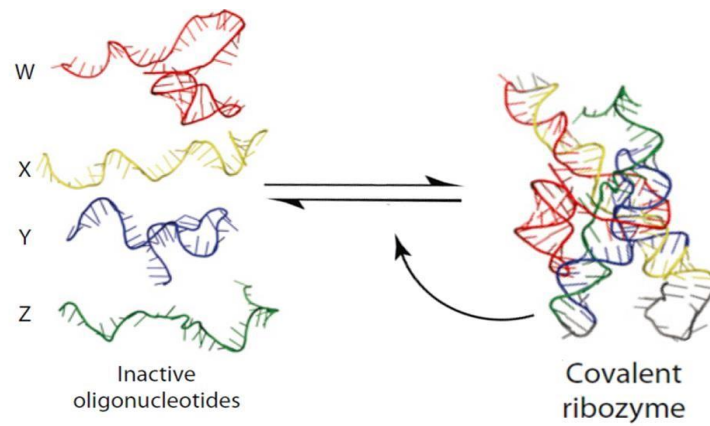


Figure 8. Schéma de l'auto-assemblage et de la reproduction de l'ARN Azoarcus. L'ARN complet Azoarcus joint entre eux des fragments d'ARN plus petits W, X, Y et Z pour former une copie de lui-même. Figure adaptée de ⁶¹.

Azoarcus tire son nom d'un des groupes de bactéries au sein duquel la molécule originale fut pour la première fois identifiée.^{62, xliv} Cet ARN a la capacité de s'extraire lui-même d'un polymère d'ARN plus long dans lequel il est inclus, à l'intérieur de bactéries. Les origines de ce type de molécules (groupe I intron) ne sont pas connues et certains spéculent même qu'elles viendraient des toutes premières formes de vie.⁶³ Elles n'ont en apparence aucune fonction pour les bactéries, mais leur extraction est nécessaire à leur survie. De ce fait, ces molécules sont maintenues par la sélection naturelle, car leur modification empêcherait cette extraction vitale.

b) Réseaux autocatalytiques d'Azoarcus (projet Startevo)

Le nom Startevo est l'intitulé de la première description du projet pour une demande de financement. Il est le résultat de la contraction de « start » et « evolution », ce qui rappelle l'ambition du projet d'explorer des mécanismes d'émergence d'évolution darwinienne. Il vise à étudier les propriétés darwiniennes de reproduction et de variation au sein de réseau de différents types d'Azoarcus (voir chapitre 5.1 pour plus d'informations). La figure suivante schématise le fonctionnement d'un tel réseau.

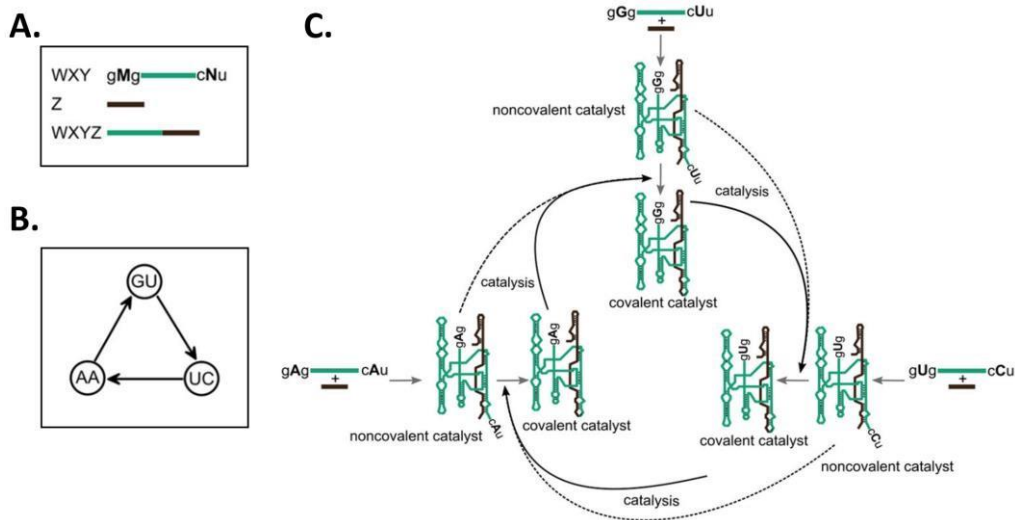


Figure 9. Schéma d'un réseau autocatalytique d'ARN Azoarcus. A. Azoarcus et fragments d'ARN. L'ARN Azoarcus complet est nommé WXYZ et est formé par la mise bout à bout de deux fragments d'ARN plus petits appelés WXY (en vert) et Z (en noir). Deux lettres M et N caractérisent les deux extrémités du fragment WXY, qui correspondent à des nucléotides (unités élémentaires de l'ARN) différents. Il existe 4 nucléotides différents caractérisés par les lettres A, U, G et C. Comme les emplacements M et N peuvent être caractérisés par chacun des 4 nucléotides, il existe 16 versions de WXY. Lorsque ceux-ci sont reliés au fragment Z, ils génèrent 16 types d'Azoarcus différents qui sont nommés selon les caractéristiques de M et N (comme « GU » si M correspond à un nucléotide G, et N correspond à un nucléotide U). **B. Cycle autocatalytique simplifié.** Du fait de la complémentarité entre les 4 nucléotides, les types d'Azoarcus peuvent synthétiser d'autres types selon la nature des extrémités du fragment

propriété « de ne pas entretenir la vie des animaux, d'être réellement non-vital ».98 Ainsi, la molécule Azoarcus, utilisée comme prototype d'être vivant, porte en son nom le fait « d'être réellement non-vital. »

WXY de départ. Dans l'exemple schématisé, les types GU synthétisent les types UC qui synthétisent les types AA, et ces derniers synthétisent les types GU, ce qui referme la boucle du réseau. **C. Cycle autocatalytique avec les fragments d'ARN visibles.** Ce schéma représente le même cycle de réaction que celui représenté dans l'encadré B. Il y est explicité le passage de fragments libres mais enchevêtrés (« noncovalent catalyst ») à des ARN d'Azoarcus complets (« covalent catalysts »). Figure adaptée de ⁶⁴.

Le projet utilise la microfluidique en gouttelettes pour étudier des milliers de réseaux d'ARN comme celui décrit dans la figure précédente. Cette analyse a pour objectif de confirmer expérimentalement l'influence de la topologie des réseaux de réactions (comme le nombre de différents types d'Azoarcus ou le nombre d'interaction entre eux) sur les propriétés darwiniennes de reproduction et de variation, auxquelles sont associés les concepts de robustesse, hérédité, de mémoire et de croissance.

Propriétés vitales incorporées par l'expérimentateur : composition (ARN), variation (ajout de certaines espèces d'ARN)

Propriétés vitales acquises par les protovies : auto-assemblage (des fragments d'ARN), cycle autocatalytique (associé à la reproduction et à la coopération), croissance / reproduction (augmentation de la population d'Azoarcus), robustesse (résistance à la variation, associé à de l'hérédité ou de la mémoire)

c) Réseaux d'ARN « cataboliques »

Ce projet est le résultat de l'exploitation de phénomènes inédits découverts par hasard pendant la mise au point de protocoles relatifs au projet Startevo. Les résultats montrent qu'Azoarcus est capable de retirer des bouts d'ARN étrangers attachés à ses sous-fragments (WXY et Z) avant de se répliquer en réseaux. Ces deux étapes sont interprétées comme des formes de catabolisme et d'anabolisme, en faisant référence au métabolisme des êtres vivants (voir partie 3.2.4.iii pour plus de précisions).

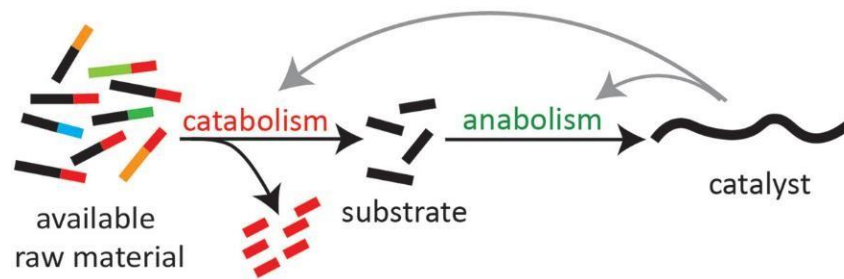


Figure 10. Catabolisme et anabolisme couplés dans des systèmes reproducteurs d'ARN. De gauche à droite. Les fragments d'ARN constitutifs d'Azoarcus (ici « catalyst ») sont de couleur noire et les morceaux d'ARN étrangers sont rouges. Azoarcus est capable de séparer les fragments noirs des morceaux rouges (catabolisme) et de constituer une nouvelle molécule d'Azoarcus (anabolisme). Figure adaptée de ⁶⁵.

Propriétés vitales incorporées par l'expérimentateur : composition (ARN)

Propriétés vitales acquises par les protovies : reproduction et coopération (cycles autocatalytiques), catabolisme (capacité à casser des fragments avant de les intégrer), anabolisme (formation d'ARN par auto-assemblage et catalyse)

d) Diversification d'ARN par Azoarcus

Ce projet est celui dont le chapitre 5. 2 est issu. Son objectif est d'exploiter les capacités catalytiques d'Azoarcus pour faire émerger de nouvelles espèces d'ARN tout en maintenant la reproduction de la molécule. De cette façon, le système mis en place combine les propriétés darwiniennes de reproduction et de variation, permettant la persistance d'un système capable de générer des molécules aux propriétés diverses.

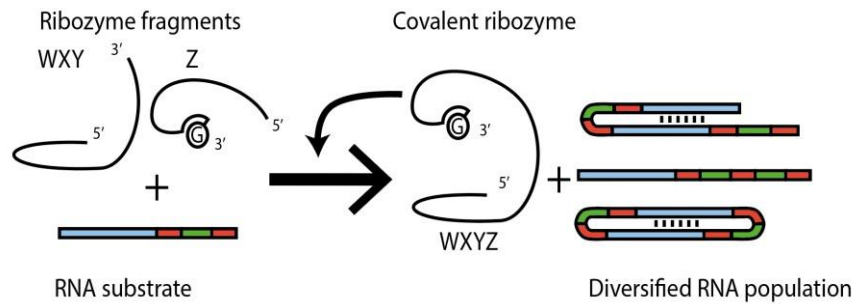


Figure 11. Reproduction et diversification dans un même système d'ARN. Azoarcus (ici « covalent ribozyme ») est capable d'associer deux fragments d'ARN (WXY et Z) ensemble pour former une copie de lui-même (WXYZ). Dans la même solution, il peut générer une diversité d'ARN plus longs, repliés, ou circulaires en associant des séries de petits fragments entre eux.

Propriétés vitales incorporées par l'expérimentateur : composition (ARN)

Propriétés vitales acquises par les protovies : auto-assemblage (des fragments d'ARN), reproduction (d'Azoarcus à partir des fragments), variation (de la population d'ARN sous l'effet d'Azoarcus)

3.2.4. Processus de fabrication et d'interprétation des protovies

Nous abordons dans cette partie une caractérisation plus fine de la production et de l'interprétation des protovies produites au laboratoire de 2010 à 2020. Par souci de nonredondance avec les parties 3.1 et 4.1, nous n'aborderons pas les processus de visualisation ni les différentes étapes de la construction des protocellules microfluidiques. Nous nous proposons d'exposer les processus de fabrication et d'interprétation de protovies en mettant l'accent sur celles constituées de réseau d'ARN.

3.2.4.i. Chaîne opératoire de la fabrication d'une protovie

Afin de capturer la démarche de fabrication et d'interprétation de protovies nous proposons de la représenter sous la forme d'une chaîne opératoire. La chaîne opératoire est un procédé de description ethnographique mise au point par André Leroi-Gourhan, puis affinée par Marcel Mauss, qui consiste à décrire les étapes successives d'un processus visant à produire un objet

ou un effet. Plus spécifiquement, elle s'attache à répertorier « les éléments hétérogènes, matériels ou non, tangibles comme intangibles, ‘imaginaires’ ou réels recrutés par ‘l’acteur’, mobilisés par le processus technique et intégrés dans le produit fini. »⁶⁶

Le schéma suivant propose de retranscrire une chaîne opératoire simplifiée de la fabrication et interprétation d'un système expérimental d'ARN catalytiques en vue de la constitution de protovies (proches de celles présentées dans la partie 5.2). Les flèches relient ensemble des objets matériels ou informationnels (encadrés et marqués d'un numéro) présentant un lien de continuité généalogique les uns envers les autres. Le texte au-dessus de chaque flèche explicite l'action qui permet le passage d'un objet à un autre. En dessous de chaque objet, sont explicités en vert l'élévation sur l'échelle de degré de vie interprétée par les chercheurs impliqués, selon la gradation suivante allant du non vivant au vivant, d'après les témoignages recueillis : 0, +, ++, +++.¹ Dans leur activité, les chercheurs n'établissent pas formellement un degré de vie, mais j'utilise cette expression pour rendre compte de l'établissement et l'accumulation de processus qu'ils estiment vitaux. Par simplicité, nous décrivons cette chaîne par l'intermédiaire des actions de Praveen (post-doctorant) qui maîtrise l'ensemble des étapes en jeu.

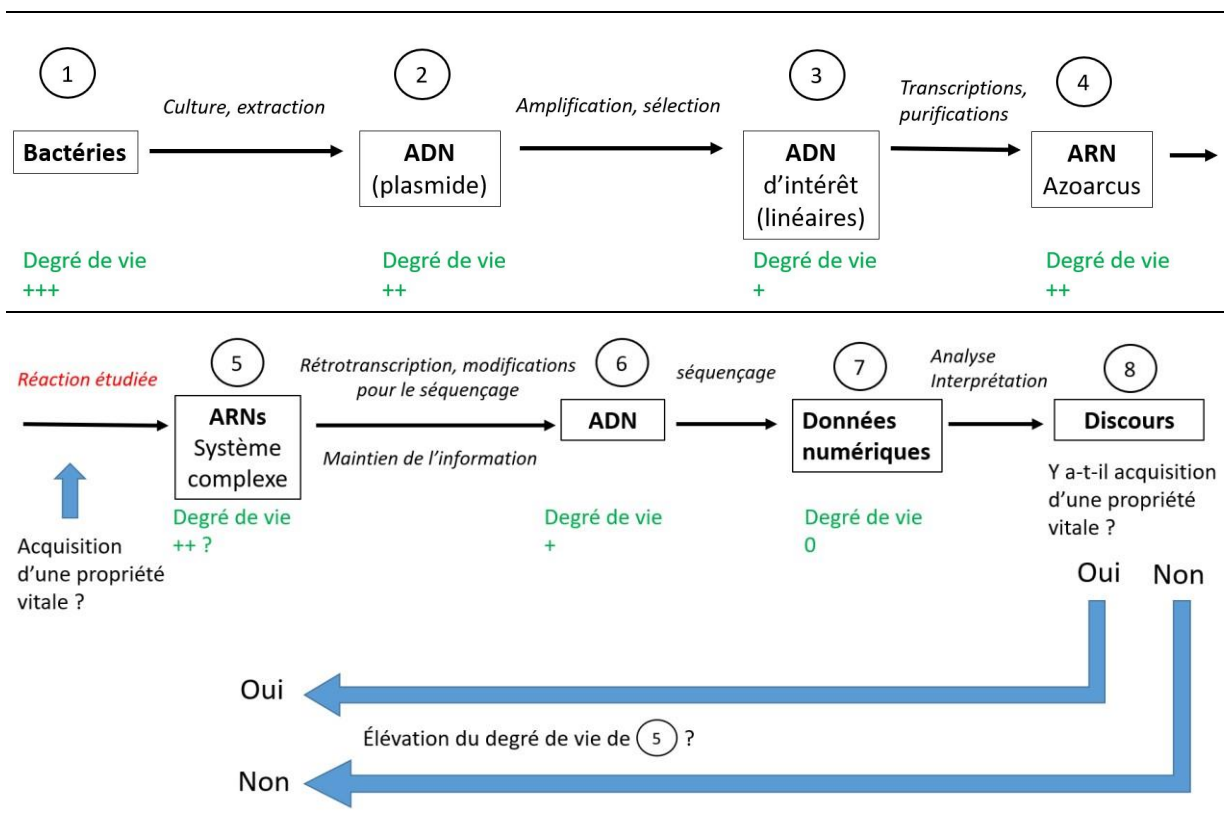


Figure 12. Chaîne opératoire de la construction et de l'interprétation d'une protovie. Les différents objets manipulés, modifiés et synthétisés au cours de la chaîne opératoire ont des degrés de vie variables. L'élévation du degré de vie de la protovie, élaborée à l'étape 5, dépend de l'issue des discussions en fin de chaîne opératoire.

¹ Pour un exemple d'établissement empirique d'une échelle de degré de vie, à partir de fouille de textes algorithmique de 30 000 articles scientifiques, voir 99.

Étape 1. Praveen est dans le local technique et ouvre la porte massive de l'imposant congélateur. Il y sort une petite boîte en plastique qu'il pose rapidement sur une table. Il ouvre le couvercle et retire de petits tubes en plastique de la boîte pour lire les inscriptions sur les capuchons. Ces mouvements sont vifs, car le contact de ses mains avec le plastique sortant d'un environnement à -80 °C lui brûle légèrement les doigts, malgré ses gants en plastique. Il recherche un tube qui comporte des bactéries congelées dans du glycérol. La fonte puis la recongélation du glycérol peut endommager les bactéries, donc il fait au plus vite. Praveen a trouvé le tube qu'il cherchait et le place dans un bac qu'il a rempli de glace. Avec son bac de glace sous le bras, il se dirige vers le Big Lab où il s'assied devant la hotte bactérienne. À l'aide d'un cône en plastique il gratte la surface du glycérol gelé au fond du tube en plastique et trempe le cône dans un tube bleu plus grand, rempli d'un liquide jaunâtre. Il dépose le tube dans un incubateur à 37 °C dans le local technique et l'y laisse toute la nuit. Les bactéries auparavant congelées, dont les phénomènes vitaux étaient donc suspendus, se multiplient et prolifèrent dorénavant dans le liquide nutritif. Le lendemain le liquide du tube est blanchâtre, signe qu'il est rempli de bactéries en suspension. Praveen prend le tube et fait subir à la solution une succession de transferts et de centrifugation pour n'obtenir à la fin qu'un minuscule volume de solutions transparente comme de l'eau. Il mesure à l'aide d'un spectrophotomètre la concentration en ADN de la solution et s'avère satisfait du chiffre qui apparaît à l'écran de la machine.

D'après le protocole utilisé, et connaissant les caractéristiques des bactéries, Praveen est convaincu que sa solution translucide comporte des ADN circulaires, connus sous le nom de plasmides. Ces derniers ont des propriétés tels que certains scientifiques les considèrent un peu plus vivants que l'inerte, à l'instar des virus, car capables d'évolution darwinienne.^{67,1} En effet ces molécules sont propagées de bactérie en bactérie, répliquées par les enzymes de celles-ci, soumises à une certaine variation et permettent l'expression de phénotypes particuliers chez la bactérie hôte qui peuvent induire une sélection positive ou négative. De ce fait les plasmides sont capables d'évolution darwinienne, à condition de pouvoir prospérer dans d'autres êtres vivants. Praveen utilise donc les bactéries comme des outils pour stocker et multiplier ses plasmides. Ils lui sont utiles car une partie de leur séquence contient l'information nécessaire pour produire une molécule qui lui sera cruciale pour l'établissement de sa protovie : Azoarcus.

Étape 2. Praveen mélange la solution de plasmides avec une poignée d'autres volumes microscopiques de solutions translucides et positionne le tube contenant le mélange dans une machine à PCR. Pendant une heure, des cycles de température activent et désactivent des protéines qui répliquent spécifiquement la portion de plasmide qui intéresse Praveen pour générer une population de petits ADN linéaires. À la fin des cycles, il transfère la solution à travers différentes membranes et obtient de nouveau un minuscule volume de solution translucide. Comme précédemment, il mesure la concentration en ADN à l'aide du spectrophotomètre et le chiffre, à peu près 100 fois supérieur à celui lu précédemment, le satisfait de nouveau. Cependant, s'il sait qu'à ce stade sa solution est remplie d'ADN, il se peut qu'il ne s'agisse pas de ceux attendus. Pour en avoir le cœur net, Praveen prend un échantillon

¹ L'échelle de degré de vie empiriquement établi par fouille de texte algorithmique, par Malaterre et Chartier,⁹⁹ attribue même un degré de vie au plasmide supérieur à certains virus.

de la solution qu'il mélange avec un liquide bleuté pour l'injecter dans un gel d'électrophorèse, dans le Small Lab. Au bout de 45 minutes, il visualise le gel dans le coffre de visualisation. La photographie à l'écran montre une bande noire nette. Comme il n'y a qu'une seule bande sur le gel, à une position précise, Praveen sait que sa solution contient une population d'ADN qui ont tous à peu près la même longueur. Et comme la longueur qu'il en déduit est celle attendue, Praveen estime qu'il s'agit bien des ADN qu'il attend, même s'il n'a pas accès à leur séquence. Il répartie ensuite la solution d'ADN dans 5 petits tubes qu'il place dans un congélateur à -20 °C dans le Big Lab. Cette fois-ci, il ne s'agit pas de plasmides, mais d'ADN plus petits et linéaires. Même au contact de bactéries, Praveen estime qu'il n'y a peu de chance qu'ils se répliquent. Pour cette raison le degré de vie de ces ADN peut être considéré comme plus faible que les plasmides précédents. Leur matérialité étant spécifique au vivant, et sachant le rôle prépondérant que prend l'ADN dans les conceptions contemporaines de la vie,⁶⁸ leur degré de vie n'est pas nul pour autant.

Étape 3. Praveen prélève un minuscule volume de la solution précédente et le mélange avec une poignée d'autres solutions translucides. Il remue le tube puis le place dans un bloc chauffant à 37 °C toute la nuit. Le lendemain matin, il regarde le tube et remarque que la solution est légèrement trouble. D'expérience, il a associé ce trouble avec la réussite du protocole. Il mélange alors la solution avec un liquide bleuté et l'insère dans un gel pour effectuer une électrophorèse. Au bout d'une heure et demie de migration, il se rend dans la salle microfluidique avec son gel et l'observe à l'aide d'une lampe UV. Il distingue des taches sombres qui sont le signe de la présence d'ARN (voir partie 3.1). Il découpe les portions de gel correspondantes aux tâches, les écrase dans des tubes remplis d'eau qu'il place dans un agitateur toute la nuit. Le lendemain, il filtre le contenu des tubes et en extrait une solution translucide. De nouveau, il prélève un petit volume qu'il insère dans le spectrophotomètre : la valeur affichée lui confirme la présence des ARN.

La réaction que Praveen a lancée toute la nuit est une transcription, au cours de laquelle des protéines fabriquent des ARN qui ont la même séquence que les ADN présents. La seule différence se situe au niveau des bases élémentaires qui constituent leur séquence et qui varient chimiquement. Cette différence est toutefois suffisante pour permettre à l'ARN de catalyser des réactions chimiques, en plus de porter une information génétique. Cette caractéristique qui lui permet d'agir autant comme une protéine que comme de l'ADN en fait une molécule idéale pour construire des systèmes chimiques simples capable de mettre en œuvre des processus vitaux. L'ARN ici fabriqué est particulièrement remarquable car il présente des propriétés catalytiques lui permettant de se reproduire et de fabriquer de nouveaux ARN (voir partie 3.2.3.iii). Cette molécule est nommée Azoarcus et les chercheurs en parlent en utilisant ce nom propre exclusivement. Ainsi, Praveen ne produit pas « de l'azoarcus », comme cela se dirait pour n'importe quel autre composé chimique du laboratoire, mais il « produit Azoarcus », ce qui peut être assimilable à un prénom attribué à un être vivant. Les processus vitaux que cet ARN particulier peut mettre en œuvre lui confère un degré de vie supérieur à l'ADN à partir duquel il a été synthétisé.

Étape 4. Une série de tubes est disposée dans un bac de glace sur la paillasse de Praveen. Il mélange leur contenu avec une pipette, secoue un tube et le place dans un bloc chauffant à 48 °C. Se faisant, il vient de mettre en contact Azoarcus (plus précisément une population de molécules Azoarcus) avec une population de petits ARN. Dans le microscopique volume de solution placé dans le bloc chauffant, Azoarcus est supposé modifier la population d'ARN en les découpant et les collant les uns avec les autres. Praveen espère que la nouvelle population d'ARN générée présentera des processus assimilables à des processus vitaux, comme la reproduction ou des formes de métabolisme (voir partie 3.2.3.iii). Après deux heures, il retire le tube du bloc chauffant, injecte une solution censée stopper net les réactions, et le dépose dans le congélateur.

Le chercheur avait déjà acquis quelques jours auparavant des connaissances sur le comportement de ces molécules à l'aide de gels d'électrophorèse. Mais ces gels ne lui confèrent qu'une information partielle sur la présence ou non d'ARN de taille spécifique à des moments donnés de la réaction. Les informations qu'il a acquises ne lui permettent pas de confirmer l'apparition de la propriété vitale qu'il suppose. Pour cette raison, il oriente alors le protocole vers un séquençage pour obtenir plus d'informations. Mais pour le moment, le degré de vie du système complexe d'ARN qu'il a mis au point et congelé est donc pour lui incertain.

Étape 5. Pour obtenir plus d'informations sur son système chimique, Praveen veut faire séquencer ses ARN par un prestataire pour connaître les séquences génétiques dans son système. Cependant le prestataire ne peut pas extraire les séquences des ARN, mais seulement celles de l'ADN. Pour cette raison, Praveen doit transposer l'information d'un support ARN à un support ADN par une réaction de « rétrotranscription » réalisée par des protéines. La synthèse d'une population d'ADN dont les séquences renvoient à celles des ARN, dénommée « librairie », nécessite une succession de réactions pour rendre l'ADN lisible par la machine du prestataire. Après deux jours de manipulation, Praveen détient dans un tube un petit volume de solution transparente qui constitue sa librairie. Cette librairie contient l'information du système d'ARN duquel elle est issue, mais n'est pas capable de réaliser les processus vitaux correspondants. De ce fait, son degré de vie n'est guère plus important que celui des ADN à l'étape 3.

Étape 6. Praveen met son tube de librairie dans une enveloppe qu'il range dans une poche de sa veste. Il prend son vélo et se dirige à l'Institut du Cerveau et de la Moelle Épinière (l'ICM) à 10 minutes du laboratoire. À l'accueil il rencontre quelqu'un, lui donne l'enveloppe puis revient au laboratoire. Il ne reverra jamais sa solution.

Une semaine plus tard, Praveen reçoit un mail du prestataire et télécharge un dossier contenant plusieurs millions de séquences d'ADN. Il traite alors ces séquences pour essayer de comprendre ce qui s'est produit dans le système de réactions d'ARN d'il y a plusieurs jours. Ces données numériques sont les seuls objets directement issus des protovies qu'il dispose. Pour lui, ces données numériques ont donc un degré de vie nul. En effet, il n'est pas familier de la culture des chercheurs en vie artificielle. Il n'y a donc pas de raison de considérer qu'un logiciel puisse être vivant, d'autant plus que les séquences qui s'affichent sous ses yeux n'ont aucune dynamique évolutive à l'écran, ou dans l'unité centrale de l'ordinateur.

Étape 7. Après quelques jours d'analyses, Praveen est en mesure d'estimer si le système chimique qu'il a étudié a acquis des propriétés vitales ou non. L'information des séquences lues sur son ordinateur, passée au crible de l'interprétation du chercheur, est maintenant intégrée dans un discours dont la validité est confrontée aux opinions de Philippe et d'Andrew qu'ils accepteront, rejeteront ou modifieront.¹ La forme finale que prend ce discours détermine l'ontologie du système chimique que Praveen a mis en place, à savoir son acquisition ou non de propriétés vitales, et donc son caractère plus ou moins vivant. À la suite des multiples discussions, le discours est restitué sur le long terme d'abord sur des diapositives, puis des posters, et enfin des articles académiques. Le discours, oral ou écrit, est ainsi la forme finale que prend une protovie du laboratoire. C'est seulement cette forme qui a de la valeur pour les chercheurs et qui conditionne leur carrière.

L'établissement de cette chaîne opératoire de fabrication et d'interprétation d'une protovie nous a montré que le fil conducteur de chacune de ces étapes se situe au niveau informationnel. En effet, la séquence génétique qui code pour *Azoarcus* est présente dans les bactéries, les plasmides, les ADN linéaires, les ARN (qui constituent véritablement *Azoarcus*), les données numériques, et partiellement dans les discours des chercheurs qui la connaissent presque par cœur. Le long de cette chaîne, les supports matériels de cette information ont des degrés de vie variables, au regard des conceptions de la vie propres aux chercheurs. Il existe des moments d'incertitude par rapport à l'évaluation du degré de vie des systèmes mis en place (ici de l'étape 5 à l'étape 8) qui se stabilise en une connaissance par des cycles d'expériences, d'analyses et d'interprétations. Cette chaîne opératoire est effective généralement après plusieurs mois d'apprentissage et de mise au point de protocoles adaptés. Cependant une partie importante du travail des expérimentateurs consiste justement à mettre au point et à adapter ces protocoles expérimentaux. Ce travail, qui fonctionne par tâtonnements successifs, n'est pas une chaîne opératoire aussi linéaire que celle que nous venons de voir.

3.2.4.ii. Tâtonnements et bricolage

Dans cette partie, nous montrons comment les scientifiques du laboratoire fabriquent des protovies, sous une modalité exploratoire qui s'éloigne d'une séquence opératoire préétablie. Comme nous l'avons vu précédemment (partie 3.2.1.iii), les techniques s'échangent au laboratoire dans un premier temps sous la forme de protocoles. Si les descriptions du protocole

¹ Certains scientifiques considèrent que des éléments de discours, les mêmes, peuvent être interprétés comme vivants car ils sont sujet à une dynamique semblable à une évolution darwinienne lorsqu'ils sont transmis d'une personne à une autre.¹⁰⁰ Les chercheurs du laboratoire de biochimie, convaincus du caractère processuel du vivant, n'en restent pas moins attachés à la matérialité des êtres vivants à laquelle les discours échappent. Ils ne les considèrent donc pas comme présentant un degré de vie notable.

ne suffisent pas (ce qui est régulièrement le cas) l'expert manie la technique à transmettre au bénéficiaire de l'expertise devant lui, et si nécessaire, regarde le bénéficiaire la manier pour le conseiller davantage. Pour Marcel Mauss, un des fondateurs de l'anthropologie des techniques, une technique est « un acte traditionnel efficace ». ⁶⁹ Cependant, au laboratoire de biochimie, la tradition qui se concrétise par la transmission des protocoles, et l'efficacité par la visualisation des résultats, sont parfois soumises à rude épreuve du fait même de la vocation du chercheur à explorer l'inconnu. La complexité des systèmes étudiés en biologie moléculaire les rend très sensibles à des paramètres que les expérimentateurs ne contrôlent pas et ignorent parfois. Cela peut induire une forte variabilité individuelle, que Ludwik Fleck avait déjà noté au début du XX^{ème} siècle pour les travaux d'histologie. ⁷⁰ Par ailleurs, chaque expérimentateur du laboratoire a la charge d'un système très précis qui varie plus ou moins de tous les autres. De ce fait, des conseils et des techniques transmis peuvent s'avérer inefficaces. Marie, qui touche à la fin de son doctorat, confie ainsi que paradoxalement, une des principales leçons qu'elle aura retenue de sa thèse est de ne pas trop écouter les conseils reçus. Les problèmes de transmissions de savoir-faire entre jeunes chercheurs partant du laboratoire et jeunes chercheurs y entrant illustrent ce propos.

En octobre 2018, Praveen est le seul chercheur du laboratoire à travailler sur les protovies établies avec *Azoarcus*. Avant son départ pour un autre postdoctorat, il s'attache à transmettre son savoir-faire relatif à ces systèmes expérimentaux à Stanislas, un doctorant qui vient tout juste d'arriver au laboratoire, et qui n'a aucune expérience technique sur ces systèmes. L'accent est alors mis sur la production d'ARN, telle que décrite dans la partie précédente, qui constitue un incontournable. Praveen effectue les manipulations devant Stanislas et lui montre les résultats qui en découlent. Mais lorsque le doctorant reproduit les techniques, les résultats diffèrent et ne sont pas exploitables, même lorsque Praveen est à côté de lui pendant les manipulations. L'absence de taches sombres sur les gels d'électrophorèse préoccupe particulièrement le doctorant. De son côté, Praveen ne s'inquiète pas et lui suggère régulièrement de changer de solution, ou de prendre des mesures de protection supplémentaires pour éviter les éventuelles contaminations qui pourraient expliquer l'absence de résultat. Mais les semaines s'écoulent jusqu'au départ de Praveen, et Stanislas n'arrive toujours pas à reproduire certains résultats. Les résultats du même protocole effectué un lundi diverge de celui effectué un jeudi. Stanislas ne comprend pas et déprime de plus en plus. À ce moment-là, il se dit que s'il n'arrive pas à refaire ce que Praveen fait si facilement et qu'il ne parvient pas à en comprendre les causes, c'est qu'il est lui-même la source du problème. Par contraste, Praveen ne se montre pas préoccupé du tout. Il confie même au doctorant avant son départ : « Je suis content que tu aies eu affaire à tant de difficultés. Maintenant tu sais comment y faire face. » Au départ de Praveen, Stanislas se retrouve seul pour tenter de faire fonctionner les protocoles transmis, même si le postdoctorant reste disponible par mail.

Un mois plus tard, Ivan, ukrainien d'origine, intègre l'équipe comme postdoctorant. Comme il est chimiste de formation, et non biologiste moléculaire (voir partie 3.2.2.ii), Stanislas a la charge de lui expliquer l'ensemble des protocoles de biologie moléculaire relatifs au projet qui lui ont été transmis par Praveen. D'emblée il le met en garde sur le fait qu'il n'arrive pas encore à obtenir certains résultats reproductibles de façon stable. Désireux de comprendre au maximum

le fonctionnement de ces derniers au niveau moléculaire, Ivan questionne les mécanismes de chaque étape. Stanislas lui répond sur ce qu'il sait mais est contraint d'admettre son ignorance sur d'autres aspects. Sollicité par mail, Praveen apporte des précisions à certaines questions. Mais lorsqu'il s'agit d'expliquer moléculairement comment telle ou telle étape du protocole fonctionne, il lui arrive de répondre qu'il ne sait pas et qu'il n'y a pas besoin de le savoir : comme il arrive à produire de bons résultats de son côté avec cette étape, c'est qu'il n'y a pas plus de raison de se questionner. Cela induit une certaine frustration chez Ivan qui juge déraisonnable de mélanger des solutions d'ARN avec d'autres solutions sans connaître les réactions chimiques spécifiques mises en jeu. Et lorsqu'il apprend que certaines solutions achetées chez des industriels ont une composition chimique confidentielle, et donc inconnue des chercheurs du laboratoire, il n'en croit pas ses oreilles. Cette incompréhension tire ses racines des différences de culture épistémologique. Ivan est chimiste organicien, et a pour habitude de chercher à comprendre chaque réaction chimique mise en jeu dans ses systèmes expérimentaux. Praveen lui, est biologiste moléculaire, et il travaille avec des biomolécules si grosses et complexes qu'il est impensable d'espérer une connaissance exhaustive de l'ensemble des réactions chimiques mises en jeu. Ivan manifeste ainsi une approche réductionniste, alors que celle de Praveen est plus phénoménologique.

Le réductionnisme d'Ivan est soumis à rude épreuve, lorsque comme Stanislas, il se retrouve incapable d'obtenir certains résultats de façon reproductible, quand bien même il a appliqué strictement le même protocole. Les mêmes effets semblent ne pas produire les mêmes causes. Au bout de plusieurs longues semaines, lassé de voir que la situation ne s'améliore pas, Ivan dit à Stanislas : « Les règles ont changé. Ce qui marchait pour Praveen ne marche plus pour nous. Nous devons trouver les nouvelles règles maintenant et arrêter de nous fier à ses conseils. » À partir de ce moment, ils se lancent tous les deux dans la constitution de nouveaux protocoles. Et après plusieurs semaines de travail, et sans qu'ils ne comprennent vraiment pourquoi, ils parviennent à mettre au point de nouveaux protocoles qui fonctionnent enfin pour de bon.

Les expériences qui ne marchent pas constituent le lot quotidien des expérimentateurs du laboratoire, qui par définition évoluent dans l'inconnu, à la frontière de la connaissance. Exténué par une semaine de manipulation ratée, Marie confie par exemple : « J'en ai marre de faire 40 fois la même chose à longueur de journée. (...) Tout le monde devrait faire une thèse. Ça t'apprend à te sentir con en permanence et donc à rester humble. » La rationalité des chercheurs est régulièrement mise à l'épreuve, comme lorsqu'ils s'étonnent de résultats parfois qualifiés de « physiquement et biologiquement impossibles ». Ces remarques montrent que la chaîne opératoire réalisée par Praveen et décrite dans la partie précédente, quoique bien réelle, fait plus office d'exception que de règle.

Certaines expériences s'éloignent encore plus d'une chaîne opératoire linéaire lorsque les chercheurs manipulent en ignorant consciemment les résultats précis qui pourraient émerger. Les expériences « exploratoires » d'Ivan en est un exemple. La première fois que Philippe lui a décrit les propriétés d'Azoarcus, il avait du mal à le croire, et il dut se convaincre par lui-même en fouillant en profondeur la littérature scientifique sur le sujet. Maintenant qu'il maîtrise les protocoles nécessaires, il est en position de tester de façon exploratoire les comportements de

cette molécule dans des systèmes complexes. Son quotidien est alors rythmé par la constitution de mélanges d'ARN et la lecture de gels parsemés de taches sombres. Allant de surprise en surprise, il mélange certains ARN en étant délibérément ignorant des résultats qui ont découleront. Il appelle cela « les expériences du vendredi » et les associe même à une certaine forme de « méditation ». Il prend un plaisir ludique et s'est d'ailleurs constitué un partenaire de jeu dans la personne d'August, en doctorat. Ce dernier s'est fait remarquer par l'ensemble du laboratoire pour avoir laissé des petits capuchons remplis d'un liquide jaunâtre sur un coin de paillasse et exhalant une forte odeur rémanente pendant plusieurs jours. Son travail de doctorat est de l'ordre théorique en lien avec les projets d'origine de la vie du laboratoire, mais ce chimiste de formation affectionne l'exploration expérimentale à peu de frais. Il a ainsi dans sa cuisine de multiples récipients de couleurs variées dont il suit l'évolution chimique par simple curiosité. Pour ce qui est des capuchons malodorants posés sur un coin de paillasse, il s'est associé avec Ivan pour explorer comment appliquer le concept biologique de communication à un niveau moléculaire, en l'absence d'être vivant. Le dispositif expérimental est constitué d'une série de capuchons remplis de différents liquides et reliés les uns les autres par de petits morceaux de papier imbibés. Étonnés par les résultats qu'ils obtiennent, Ivan et Auguste les présente à Philippe qui semble très intéressé. Ces expériences sont éloignées des objectifs à long terme que Philippe leur a proposés. Mais cela n'est pas pour le déplaire non plus, car il est convaincu que les plus grandes découvertes peuvent émaner de tels comportements.

Accumuler les résultats empiriques, sans apposer de cadres théoriques contraignants au préalable, est une pratique ancienne, mais qui refait surface dans la recherche sur les origines de la vie particulièrement ces dernières années. Un article publié dans la revue *Philosophical Transactions of the Royal Society A* en 2017 fait office de tribune avec le constat et la suggestion suivante :

« In practice, the development of theories is almost always preceded by observational results. Much current in origin of life research tries to do this in the opposite order, first proposing a theory of how life began, and then performing experiments to test or demonstrate it. Our proposal is that the field should include a work that focuses on generating observational results about the behaviour of messy, complex chemistries, regardless of any immediate interpretation of how this could lead to biology. »

Nous montrons dans la partie 5.1.5 que cette opinion est partagée par plusieurs équipes de recherche qui s'attachent à explorer les comportements de systèmes chimiques complexes, dans le but de se laisser surprendre par des phénomènes qui pourrait s'interpréter comme de l'abiogenèse. Philippe est sensible à cette démarche, et propose de temps à autre aux chercheurs qu'il encadre de maintenir des réactions d'ARN pendant plusieurs semaines pour peut-être découvrir des phénomènes inattendus.

Les démarches que nous venons de décrire s'apparentent ainsi à ce que François Jacob appelle du « bricolage »⁷¹ en s'appuyant sur les travaux de Claude Lévi-Strauss.⁷² Pour expliquer le

fonctionnement de l'évolution par sélection naturelle, Jacob file la métaphore du bricoleur par opposition à celle de l'ingénieur. En ce sens, il affirme :

« [evolution] works like a tinkerer - a tinkerer who does not know exactly what he is going to produce but uses whatever he finds around him whether it be pieces of string, fragments of wood, or old cardboards; in short it works like a tinkerer who uses everything at his disposal to produce some kind of workable object ». Et au contraire « For the engineer, the realization of his task depends on his having the raw materials and the tools that exactly fit his project. »

Ainsi Ivan et August reproduisent le travail de l'évolution telle que décrite par Jacob : sans finalité préétablie, ils utilisent ce qu'ils ont sous la main pour produire une variété de systèmes non optimisés, dont certains seront des protovies.

3.2.4.iii. De l'interprétation à la narration

La partie précédente nous a montré que les chercheurs du laboratoire produisent des résultats parfois inattendus qui ne sont pas l'aboutissement d'une réflexion théorique préalable. Toutefois, s'ils désirent utiliser ces derniers dans des publications scientifiques, ils doivent élaborer une narration dans laquelle les résultats présentés s'insèrent logiquement et répondent à des problèmes bien identifiés. La nouveauté d'un phénomène ne suffit pas pour publier dans les journaux les plus prestigieux (que les chercheurs visent pour améliorer leurs perspectives de carrière). Ils doivent montrer pourquoi sa mise en évidence contribue aujourd'hui à mieux comprendre un questionnement majeur auquel il faut répondre définitivement. Cette contrainte participe grandement à creuser le fossé entre contexte de découverte et contexte de justification. Un des articles issus des projets ARN et origine de la vie du laboratoire illustre ce propos.

Praveen et Samuel travaillent maintenant depuis plus d'un an sur l'étude de réseau d'ARN avec différentes versions d'Azoarcus. Les expériences sont lourdes, les résultats peinent à arriver, et les deux chercheurs sont perturbés face à l'absence d'objectifs précis de publication. Praveen est particulièrement anxieux car il n'a toujours pas de perspective de publication concrète. Philippe l'a déjà dissuadé plusieurs fois de ne pas quitter le laboratoire et de persévérer sur ce projet, mais les objectifs à long terme de celui-ci n'offrent pas la possibilité d'une publication sur le court terme dont Praveen estime avoir tant besoin pour son CV.

Un des enjeux du système expérimental d'ARN en question est de mettre au point des marqueurs moléculaires pour que les différentes molécules d'Azoarcus soient reconnues dans le processus de séquençage. Après plusieurs échecs, Praveen décide d'opter pour une stratégie qui consiste à attacher des petits fragments d'ARN, appelées « queues », sur des molécules complète d'Azoarcus ou des fragments d'Azoarcus (voir partie 3.2.3.iii, projet « catabolisme »). Pour ce faire il produit différents fragments flanqués de queues, les mélange puis laisse le tout pendant quelques heures dans un bloc chauffant. Au moment de la visualisation des résultats, il est perplexe car des taches inattendues se trouvent sur le gel. Après réflexion avec Samuel, il en déduit qu'Azoarcus coupe les queues des fragments, et que cette méthode de

marquage constitue donc un échec supplémentaire. Cependant, Praveen n'en reste pas là. Il connaît bien la littérature autour du comportement de cette molécule et n'a aucun souvenir d'avoir déjà rencontré la description du phénomène qu'il observe. Après quelques jours de recherches bibliographiques, le chercheur en est convaincu : il s'agit d'un phénomène nouveau. Praveen qui a tant besoin de publications pour progresser dans sa carrière ne compte pas laisser passer cette opportunité. Cependant, le caractère inédit de la chose est loin d'être suffisant pour constituer une publication dans un journal important. Lorsqu'il présente ces résultats à Philippe et Andrew, ils témoignent leur intérêt mais n'estime pas cela suffisant pour y consacrer un article. Praveen, qui a convaincu Samuel, qui a lui aussi besoin d'une publication, n'entend pas lâcher l'affaire et enchaîne les expériences pour évaluer s'il peut reproduire ce nouveau phénomène dans plusieurs types de réseaux d'ARN. Comme les résultats sont positifs, et à force de persistance, le duo obtient l'aval de Philippe et d'Andrew, mais sans grande conviction, pour écrire une proposition d'article sur la base de ce phénomène.

Les premières versions de l'article vantent la démonstration de la robustesse de l'autoassemblage et de la reproduction de différents Azoarcus en réseau, et en présence de queues d'ARN dont ils arrivent à se débarrasser. Mais un jour, Andrew suggère en réunion que le phénomène mis en évidence pourrait très bien être interprété comme étant une forme de « catabolisme », dont la signification est la suivante. Le métabolisme est le nom donné à l'ensemble des réactions chimiques qui permet le maintien en vie d'une cellule ou d'un organisme. Ces réactions peuvent se diviser en deux parties : l'anabolisme d'une part, c'est-à-dire les réactions qui permettent de construire les molécules constitutives de la cellule ; et le catabolisme d'autre part qui caractérise l'ensemble des réactions qui découpent des molécules de la cellule pour en tirer l'énergie nécessaire à son fonctionnement. Il se trouve que Niles Lehman, un collaborateur étatsunien du projet, a publié en 2008 un article intitulé : « Systems chemistry on ribozyme self-construction: Evidence for anabolic autocatalysis in a recombination network »⁷³ et qui associe l'auto-assemblage d'Azoarcus à de l'anabolisme car il s'agit de la formation de macromolécules (non pas constitutives d'un être vivant, mais protovivants en l'occurrence). Le phénomène mis en évidence par Praveen et Samuel montre qu'Azoarcus est capable de casser des fragments d'ARN en plus petits fragments (c'est à dire de retirer leur queues) pour former une autre molécule d'Azoarcus à partir d'eux. Pour Praveen, Samuel et Philippe, la suggestion d'Andrew ne fait aucun doute : il est possible d'interpréter ce phénomène comme étant du catabolisme, au même titre que l'interprétation d'anabolisme qui a déjà été publié dans une bonne revue. À partir de ce moment, les chercheurs du projet sont tous d'accord de l'intérêt de publier une telle histoire. Car ici, c'est bien l'histoire qui est déterminante dans la volonté de poursuivre l'écriture de cet article. Peu de temps avant, il s'agissait d'une démonstration de la robustesse d'une reproduction moléculaire, maintenant il s'agit d'une démonstration d'un phénomène couplé de catabolisme et d'anabolisme. L'association de ces nouveaux concepts semble avoir fait progresser le degré de vie cette protovie dans le discours des chercheurs, inscrit dans la publication parue en 2018 dans une excellente revue de biologie moléculaire : « Coupled catabolism and anabolism in autocatalytic RNA sets ».⁶⁵

Le système expérimental de Praveen et Samuel témoigne ainsi du fait qu'un même phénomène physico-chimique peut être interprété de différentes façons au sein du processus d'extension du

regard biologique. Pour les projets d'origine de la vie du laboratoire, ce processus prend particulièrement forme pendant les réunions d'écriture d'articles pendant lesquelles les différents coauteurs négocient entre eux l'application ou non de certains concepts biologiques aux phénomènes physico-chimiques qu'ils observent. La question principale se résume à :
« jusqu'où pouvons-nous pousser l'interprétation biologique, pour 'vendre' l'article, tout en restant rigoureux scientifiquement et recevable pour l'éditeur, les relecteurs et le lectorat visé ?
»

Dans ce travail d'extension biologique, certains concepts ne passent pas le crible de la sélection des négociations. Par exemple, après délibérations il est jugé par les auteurs de l'article du projet Chemfit (voir chapitre 4) que les gouttes d'eau ne présentent pas d'hérédité, comme cela a été pourtant plusieurs fois soutenu à l'oral, mais présentent une « hérabilité non génétique » qui décrit plus justement les résultats générés. De même, les gouttes d'eau qui étaient qualifiées d'efficaces, de gagnantes, puis de chanceuses à l'oral et dans des communications écrites intermédiaires, sont dorénavant décrites dans l'article en finalisation comme des « 0.2 M C2 droplets », ne faisant donc plus que référence à leur composition chimique et sans plus d'interprétation. Il en va aussi de même pour les gouttes qui étaient considérées « mortes » à l'oral et dont aucune trace ne reste dans l'article. Certains chercheurs s'opposent même frontalement entre eux sur la possibilité d'appliquer certains concepts biologiques. Par exemple, Eörs est très critique envers Niles qui considère que les réseaux d'Azoarcus constituent une réelle « coopération ». Pour le premier, théoricien de l'évolution, il est inacceptable d'appliquer ce concept très bien défini dans sa discipline à ce système, alors que le second, biochimiste, est enclin à adapter ce concept à d'autres systèmes. Ce phénomène d'interprétations divergentes d'un même phénomène a déjà été observé dans des ethnographies de laboratoire dont celle de Sophie Houdart dans un laboratoire japonais de génétique comportementale.¹⁶ En effet une même drosophile mutante au comportement sexuel altéré est tantôt considérée comme « homosexuelle » ou bien comme « asexuelle » selon les laboratoires. Pareillement, le comportement d'un système physico-chimique pourrait être interprété comme une protovie ou non selon les conceptions de la vie en vigueur dans les laboratoires.

3.2.5. Finalement, qu'est-ce qu'une protovie ?

Les parties précédentes nous ont montré les théorisations, fabrications, interprétations et restitutions d'une variété de protovies. Nous avons donné une rapide définition de ce terme dans le chapitre précédent (3.1), qui n'est pas formellement employée par les chercheurs du laboratoire, mais qui rend compte efficacement de la particularité de l'originalité d'une série d'artéfacts produits au laboratoire.

Les protovies sont censées fournir des explications de passages de l'inerte au vivant et sont capables de maintenir des propriétés vitales implémentées ou d'en acquérir de nouvelles par leur

propre agentivité.¹ Par conséquent, leurs créateurs leur confèrent un certain degré de vie intermédiaire entre le non-vivant et le pleinement vivant. Par ailleurs, comme les propriétés vitales sont des propriétés qui sont jugées nécessaires pour qu'un système puisse être qualifié de vivant, elles diffèrent suivant les conceptions de la vie supposées, qui ne font pas actuellement l'objet d'un consensus scientifique. Ainsi un objet protovivant selon un cadre théorique peut ne pas l'être selon un autre, ce qui explique les différentes interprétations de chercheurs provenant de cultures épistémiques éloignées. Étudier une protovie, c'est donc étudier la conception de la vie de ses créateurs qui s'y incarne totalement ou partiellement. En ce sens, elles sont des exemple de « théories réifiées » au même titre que les instruments d'analyse des laboratoires de science.^{14,74}

Fort des aspects que nous avons développés dans ce chapitre, nous pouvons maintenant comparer ce concept de protovie avec d'autres concepts définis par des travaux scientifiques, philosophiques ou anthropologiques connexes. Il s'agit de montrer la spécificité de la protovie qui justifie un nouveau cadre conceptuel.

Le terme « protovie » (ou « protovivant ») ne fait pas l'objet d'élaboration conceptuelle dans les publications scientifiques de langue française. De très rares occurrences désignent des entités intermédiaires dans des scénarios d'origine de la vie.⁷⁵ Les termes anglais « protolife » et « protoliving » (que j'utilise aussi pour traduire le concept), se retrouvent ponctuellement dans la littérature scientifique anglophone, bien plus importante que celle francophone, mais de façon marginale. Leur emploi sert de nouveau à caractériser des systèmes intermédiaires entre le non-vivant et le vivant mais principalement dans le cadre de l'origine historique de la vie telle que nous la connaissons,⁷⁶ avec parfois une dimension synthétique supplémentaire.⁷⁷ De leur côté, les protovies telles que nous les avons définies sont exclusivement synthétiques et peuvent s'inscrire dans une vie non nécessairement contrainte par le monde biologique connu et son histoire.

La simple caractéristique d'être situé quelque part entre l'inerte et le vivant nous amène à nous poser la question suivante : les protovies sont-elles des infravies ? Dans son livre, « Infravies – Le vivant sans frontières »,⁷⁸ le biologiste Thomas Heams fait un tour d'horizon des entités naturelles, artificielles, réelles ou imaginaires qui se situent dans la zone grise entre le non-vivant et le vivant. Il regroupe cet ensemble sous le terme « d'infravie » mais propose aussi d'inclure les êtres pleinement vivants dans cet ensemble. Cette proposition théorique vise

¹ Nous avons vu dans la partie 3.2.1.v qu'un flou conceptuel ressort de certaines descriptions de projets. Les mêmes processus sont tantôt considérés comme des modélisations de propriétés vitales ou comme des propriétés vitales en tant que telles, ce qui témoigne qu'ils peuvent être les deux à la fois aux yeux de certains chercheurs. La modélisation d'un processus peut ainsi se confondre avec une instance de ce processus. Ceci ne semble pas déranger les scientifiques du laboratoire dont les objets modélisés et les modèles sont tous deux matériels, ce qui n'est pas le cas pour les simulations informatiques par exemple. La question de savoir si une simulation de vie sur ordinateur peut être une instance de vie cristallise des débats scientifiques et philosophiques.101,102

à dépasser la frontière entre non-vivant et vivant pour stimuler un champ de recherche sur le monde infravivant, dont nous pensons que le travail retranscrit dans ce manuscrit de thèse participe. La vie n'est alors qu'un exemple d'infravie qu'il définit comme « une mise en mouvement adaptative de la matière ». Heams considère cette définition en l'état comme heuristique, et peut-être provisoire. La difficulté à définir l'infravie est en effet le corollaire de celle à définir la vie. Néanmoins, nous pouvons dire que les protovies sont des exemples d'infravies, mais que la réciproque peut être fautive. Les protovies incluent une dimension nécessairement artificielle et une notion de progression vers un état plus vivant. Elles représentent donc une sous-catégorie d'infravies. Par ailleurs les infravies ne doivent pas être confondues avec les « systèmes infrabiologiques » que nous avons évoqués dans la partie 3.2.1.v. Ce concept forgé par Szathmary, Santos et Fernando⁷⁹ s'appuie sur le modèle du Chemoton de Tibor Gánti comme une « unité de vie » composé de trois sous-systèmes informationnel, métabolique et de compartimentation couplés entre eux. Un système infrabiologique qualifie alors tout sous-système qui ne comporte que deux de ces sous-systèmes couplés entre eux. Défini de cette façon, certaines protovies peuvent être considérées comme des systèmes infrabiologiques mais d'autres non car trop élémentaires pour pouvoir présenter un tel couplage. De plus, le vivant vers quoi pourraient évoluer les systèmes infrabiologiques est dépendant d'une conception précise de la vie, associée au Chemoton, là où la protovie est valable pour toutes les conceptions du vivant. Les catégories de protovies et de systèmes infrabiologiques se recoupent donc mais diffèrent.

Comme les chercheurs incorporent des propriétés vitales, qu'ils observent chez des êtres vivants, dans des protovies, nous pouvons nous demander si ces dernières sont des objets biomimétiques. Tout d'abord les discussions entre scientifiques d'une part et les restitutions des travaux d'origine de la vie du laboratoire de biochimie d'autre part ne mentionnent jamais le biomimétisme. Cette pratique consiste à produire des artefacts en s'inspirant de propriétés d'êtres vivants. Des gants inspirés de la peau adhésive des pattes du gecko ou la forme du train Shinkansen inspiré du bec du martin-pêcheur sont régulièrement cités comme des exemples en la matière.¹ Les protovies recoupent, mais se démarquent des objets biomimétiques principalement pour deux raisons. Premièrement, les propriétés incorporées dans les protovies ne sont pas seulement des propriétés d'êtres vivants, mais des propriétés vitales. C'est à dire que les premières sont présentes chez certains êtres vivants mais contingentes à la vie (la peau adhésive des pattes du gecko, le bec du martin-pêcheur etc), alors que les secondes sont jugées nécessaires à la vie (métabolisme, évolution etc.). Deuxièmement, les protovies sont dynamiques et s'inscrivent dans une élévation de leur degré de vie par l'acquisition de propriétés vitales. De ce fait les propriétés vitales ne sont pas seulement implantées par un concepteur, mais en partie acquises par les protovies elles-mêmes, ce qui est absent de la démarche

¹ La pratique de cette démarche est en réalité bien plus complexe, voir 27 pour plus d'informations.¹ J'appelle ici « forme de vie », la traduction de *life form* en anglais que l'on retrouve ailleurs traduit sous le terme « forme vivante », à ne pas confondre avec d'autres usages du terme

biomimétique. Et enfin, les objets biomimétiques ne copient que certains traits d'êtres vivants particuliers alors que les protovies peuvent être amenées à devenir de véritables formes de vie.

Le concept de « forme de vie » (*life form*),¹ justement, a fait l'objet d'une analyse par les anthropologues Sophia Roosth et Stefan Helmreich qui ont étudié les transformations successives de ce terme du XVIII^{ème} au XX^{ème} siècles.⁸⁰ Ils décèlent trois grandes manières de concevoir les formes de vie qui se sont succédées : par des raisonnements déductifs, inductifs et abductifs. Le raisonnement déductif, qui tire des conclusions à partir de principes connus plus larges, prévalait au XVIII^{ème}, notamment chez les biologistes romantiques allemands pour qui les formes de vies étaient des catégories du vivant directement déductibles d'un principe esthétique vital transcendant et s'appliquant à chaque environnement. Mais avec le succès de la théorie de l'évolution au XIX^{ème}, les formes de vie sont alors envisagées dans un cadre inductif, c'est-à-dire du particulier au général. Il n'y a plus de principe vital platonicien, les formes de vie sont le résultat de la sélection naturelle. Et enfin au XX^{ème}, les formes de vie commencent à être pensées dans un cadre abductif, que les auteurs définissent comme un raisonnement spéculatif à partir de prémices incertaines sur la nature de la vie, dont la nôtre n'est qu'un exemple. Roosth et Helmreich placent les recherches en vie artificielle et en biologie synthétiques dans cette lignée à laquelle nous pouvons ajouter la fabrication de protovies dans toutes leurs diversités.

Les nouvelles formes de vie issues des biotechnologies modernes ont été étudiées dans le cadre d'un travail collaboratif de chercheurs en études des sciences et techniques regroupant un ensemble d'enquêtes ethnographiques, mettant en avant les rapports complexes et fluctuant de la société envers la vie qui en découlent.⁸¹ Ces entités sont regroupées sous le terme de « bioobjet » (*bio-object* en anglais) qui est censé faciliter l'étude des phénomènes sociotechniques à travers lesquels on retrouve de nouveaux assemblages conceptuels de relations à la vie, ou assemblages de matériaux auxquels la notion de vie est attribuée. Des objets aussi variés que les organismes génétiquement modifiés, les embryons extra-utérins ou les cultures de cellules souches sont regroupés sous cette catégorie conceptuelle. Des micro-ARN ont notamment été étudiés dans ce cadre théorique⁸² car leur capacité à passer d'une espèce à une autre, notamment des plantes aux animaux, participe à changer des perspectives sur la frontière entre les espèces. Les protovies, dont certaines sont aussi des ARN, peuvent de même être à l'origine de reconfigurations des conceptions de la vie dans la société et sont donc des exemples particuliers de bio-objets. Les effets sur la société sont visibles dans les articles de presse qui rendent compte de leur fabrication par des titres comme « Chemical creation of life » (The New York Times, 01/03/1905) ou « And man made life. The first artificial organism and its consequences » (The Economist, 20/05/2010). Ces articles ont accompagné les fabrications de protovies depuis le début du XX^{ème} siècle avec enthousiasme, crainte ou malentendus.⁸³ Leurs titres, comme ceux que nous venons d'évoquer, alimentent une certaine incompréhension d'une partie de la société vis à vis des travaux de chercheurs qui sont encore très loin d'avoir « créé la vie ». Mais les

« forme de vie », traduit de l'anglais *form of life*.¹⁰³ Ludwig Wittgenstein a initialement défini le terme « form of life » (*lebensform* en allemand) comme étant un cadre de référence dans lequel le langage tire sa signification.¹⁰⁴ Les historiens, sociologues et anthropologues ont par la suite utilisé ce terme pour décrire les visions du monde scientifiques, religieuses,

économiques ou éthiques. Stefan Helmreich utilise par exemple ce concept pour désigner des manières de penser sociales, symboliques et pragmatiques qui organisent les communautés humaines.¹⁰⁵ Les nouvelles manières d'interagir avec le vivant, dont la biologie de synthèse fait partie, entremêlent des nouvelles entités vivantes (life forms) avec de nouvelle manière d'envisager le monde et la vie (forms of life). Pour plus d'informations sur le concept de « form of life », voir 106.

journalistes ne sont pas les seuls responsables de ces malentendus. L'institution de la publication scientifique implique que les articles aux titres vendeurs sont aussi favorisés dans l'espoir d'accumuler des citations, tels que « The Emergence of Life as a First-Order Phase Transition »⁸⁴ ou « Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome ».⁸⁵

Ces titres montrent que ce ne sont pas les protovies qui constituent les productions finales que les scientifiques recherchent, mais bien les histoires qu'ils peuvent en tirer pour leurs articles. Par conséquent les protovies sont des exemples de ce que l'anthropologue Heather Paxson appelle des « produits inachevés » (*unfinished commodities* en anglais). Dans son ethnographie de la production et de la vente de fromage artisanal aux États-Unis,⁸⁶ Paxson montre que la valeur marchande des fromages ne se comprend pas sans les histoires qui sont racontées sur leur fabrication. Par conséquent, le fromage en tant que tel est un produit inachevé et qui ne sera achevé qu'avec l'accompagnement d'un récit. De façon encore plus frappante, les protovies n'ont aucune valeur sans les récits qui en sont tirés. La facilité avec laquelle ils jettent leurs protovies après avoir collecté les résultats en témoignent d'autant plus. Par conséquent les existences des protovies sont de courte durée et coïncident avec des événements ponctuels dans le laboratoire, contrairement aux cellules biologiques dont les cultures sont maintenues ou conservées au congélateur par exemple. Cela n'a pas échappé à la bioéthicienne Laurie Zoloth qui, en analysant les artefacts produits par l'équipe d'une des figures de proue de la recherche sur l'origine de la vie, celle de Jack Szostak, développe une nouvelle catégorie conceptuelle pour les décrire, à savoir des « event entities » ou « eventities » (de la contraction des mots « event » et « entities »), censée rendre compte de leur aspect matériel et processuel.⁸⁷ Ces « eventities » produites par l'équipe de Szostak (principalement des systèmes d'ARN et des protocellules) sont pleinement des exemples de protovies.

Les protovies sont ainsi des objets artéfactuels entre l'inerte et le vivant, et évoluant vers des degrés de vie supérieurs par acquisition de propriétés vitales. Elles possèdent une composante biomimétique, elles incarnent les conceptions de la vie de leurs créateurs, et aboutissent à la constitution de récits qui sont la forme finale recherchée. Leur production et leur analyse scientifique, nous permettent d'en apprendre plus sur la transition de l'inerte au vivant et nous offrent une compréhension des conceptions de la vie de leurs créateurs par une analyse épistémologique.

Références

1. Lauth C. *Rapport Général Sur l'histoire et Le Fonctionnement de l'Ecole.*; 1900.
2. Charlier-Tabur. L'Ecole de Physique et de Chimie. *Le Temps.* 1898.
3. Lauth C. *Note Adressée Au Ministre Du Commerce.*; 1878.
4. Biquard P. *Du Radium Aux Micropresseurs.* Paris: IDSET; 1982.
5. Latour B. *Nous n'avons Jamais Été Modernes. Essai d'anthropologie Symétrique.* la Découverte.; 1997. doi:10.4000/books.septentrion.6765
6. Marry C. Le plafond de verre dans le monde académique : l'exemple de la biologie. *Idées économiques Soc.* 2008;N° 153(3):36. doi:10.3917/idee.153.0036
7. Roosth S. *Synthetic : How Life Got Made ?* Chicago: The University Of Chicago Press; 2017.
8. Daisy Ginsberg A. *The Synthetic Kingdom.*; 2009.
9. Woese CR. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(15):8392-8396. doi:10.1073/pnas.97.15.8392
10. Hayden C. Kinship theory, property, and the politics of inclusion: From lesbian families to bioprospecting in a few short steps. *Signs (Chic).* 2007;32(2):337-345. doi:10.1086/508220
11. Bernard C. *Leçons Sur Les Phénomènes de La Vie Communs Aux Animaux et Aux Végétaux.* Paris: Librairie J.-B. Baillière et Fils; 1878.
12. Canguilhem G. La théorie cellulaire. In: *La Connaissance de La Vie.* ; 2015:53-101.
13. Puck TT, Marcus PI. A Rapid Method for Viable Cell Titration and Clone Production With Hela Cells in Tissue Culture: the Use of X-Irradiated Cells To Supply Conditioning Factors. *Proc Natl Acad Sci.* 1955;41(7):432-437. doi:10.1073/pnas.41.7.432
14. Latour B, Woolgar S. *Laboratory Life. The Construction of Scientifics Facts.*; 1979. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
15. Schwennesen N. At the Margins of Life: Making Fetal Life Matter in Trajectories of First Trimester Prenatal Risk Assessment (FTPRA). In: Vermeulen N, Tamminen S, Webster A, eds. *Bio-Objects, Life in the 21st Century.* Ashgate; 2012:117-131.
16. Houdart S. *La Cour Des Miracles.* Paris: CNRS Editions; 2007.
17. Bains S. Questioning the integrity of the John Templeton Foundation. *Evol Psychol.* 2011;9(1):92-115. doi:10.1177/147470491100900111
18. Benson H, Dusek JA, Sherwood JB, et al. Study of the Therapeutic Effects of Intercessory Prayer (STEP) in cardiac bypass patients: A multicenter randomized trial of uncertainty and certainty of receiving intercessory prayer. *Am Heart J.* 2006;151(4):934-942. doi:10.1016/j.ahj.2005.05.028
19. Hauskeller C. Toward a Critical Evaluation of Protocells Research. In: Bedau MA, Parke EC, eds. *The Ethics of Protocells.* Cambridge: The MIT Press; 2009:307-332.

20. Nghe P, Hordijk W, Kauffman SA, et al. Prebiotic network evolution: Six key parameters. *Mol Biosyst.* 2015;11(12):3206-3217. doi:10.1039/c5mb00593k
21. Richtig G, Berger M, Lange-Asschenfeldt B, Aberer W, Richtig E. Problems and challenges of predatory journals. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2018;32(9):14411449. doi:10.1111/jdv.15039
22. Latour B. *Le Métier de Chercheur Regard d'un Anthropologue.* INRA editi. Paris; 2001.
23. Zaug, Arthur J., Cech, Thomas R. The intervening sequence RNA of Tetrahymena is an enzyme. *Science.* 1986;231:470-475.
24. Gilbert W. The RNA world. *Nature.* 1986;319(February):618. doi:10.1038/319618a0
25. Lewontin RC. The units of selection. *Novartis Found Symp.* 1970;213:1-19. doi:10.1146/annurev.es.01.110170.000245
26. Griffiths AD, Tawfik DS. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat Biotechnol.* 1998;16(July):652-656.
27. Provost F, Kamili L, Pitrou P, Provost F, Kamili L, Pitrou P. Inquiring into the imitation of living beings. Methodological remarks. *Techniques & Culture.* 2020;73:208-224.
28. Agresti JJ, Kelly BT, Jäschke A, Griffiths AD. Selection of ribozymes that catalyse multiple-turnover Diels-Alder cycloadditions by using in vitro compartmentalization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(45):16170-16175. doi:10.1073/pnas.0503733102
29. Loakes D, Holliger P. Darwinian chemistry: towards the synthesis of a simple cell. *Mol Biosyst.* 2009;5:686-694. doi:10.1039/b904024b
30. Umbanhowar PB, Prasad V, Weitz DA. Monodisperse emulsion generation via drop break off in a coflowing stream. *Langmuir.* 2000;16(2):347-351. doi:10.1021/la990101e
31. Smith JM, Szathmáry E. *The Major Transitions in Evolution.* Oxford: Oxford University Press; 1995.
32. Szathmary E, Smith JM. *The Origins of Life.* Oxford: Oxford University Press; 1999.
33. Ganti T. *The Principles of Life.* Oxford: Oxford University Press; 2003.
34. Santos M. An interview with Eörs Szathmáry. *Boletín la SESBE.* 2020;14(11):60-72.
35. Szathmáry E. The origin of replicators and reproducers. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2006;361(1474):1761-1776. doi:10.1098/rstb.2006.1912
36. Grey D, Hutson V, Szathmary E. A re-examination of the stochastic corrector model. *Proc R Soc B Biol Sci.* 1995;262(1363):29-35. doi:10.1098/rspb.1995.0172
37. Mills DR, Peterson RL, Spiegelman S. An Extracellular Darwinian Experiment with SelfDuplicating Nucleic Acid Molecule. *Proc Natl Acad Sci.* 1967;58:217-224.
38. Gardner M. Mathematical Games. *Sci Am.* 1970;223(4):120-123. doi:10.1038/scientificamerican1281-18

39. Glade N, Bastien O, Ballet P. Diversity and survival of artificial lifeforms under sedimentation and random motion. *Theory Biosci.* 2017;136(3-4):153-167. doi:10.1007/s12064-017-0254-1
40. Turney PD. Evolution of Autopoiesis and Multicellularity in the Game of Life. *Artif Life.* 2021;27(1):26-43. doi:10.1162/artl_a_00334
41. Helmreich S. *Silicon Second Nature*. Berkeley and Los Alamos: University of California Press; 2000.
42. Caschera F, Noireaux V. Integration of biological parts toward the synthesis of a minimal cell. *Curr Opin Chem Biol.* 2014;22:85-91. doi:10.1016/j.cbpa.2014.09.028
43. Machery E. Why I stopped worrying about the definition of life... and why you should as well. *Synthese.* 2012;185(1):145-164. doi:10.1007/s11229-011-9880-1
44. Levesque HJ. Logic of Implicit and Explicit Belief. In: *Proceedings of the Fourth National Conference on Artificial Intelligence.* ; 1983:198-202.
45. Doyle J. Constructive belief and rational representation. *Comput Intell.* 1989;5(1):1-11. doi:10.1111/j.1467-8640.1989.tb00311.x
46. Benner SA. Defining Life. *Astrobiology.* 2010;10(10):1021-1030. doi:10.1089/ast.2010.0524
47. Joyce GF. Foreword. In: Deamer DW, Fleischaker G, eds. *Origins of Life : The Central Concepts*. Boston: Jones and Bartlett Publishers; 1994.
48. Guthrie S. *Faces in the Clouds*. Oxford: Oxford University Press; 1993.
49. Aristote. *La Politique*. (Tricot J, ed.). Paris: Vrin; 1995.
50. Arendt H. *Condition de l'homme Moderne*. Calmann-Lé. Paris; 1961.
51. Agamben G. *Homo Sacer, Vol. I, Le Pouvoir Souverain et La Vie Nue*. Seuil. Paris; 1997.
52. Fassin D. *La Vie - Mode d'emploi Critique*. Paris: Seuil; 2018.
53. Jacob F. *La Logique Du Vivant*. Paris: Gallimard; 1970.
54. Helmreich S. Extraterrestrial Seas: Astrobiology and the Nature of Alien Life. In: *Alien Ocean*. University of California Press; 2009:250-284.
55. Pitrou P. Life as a Making. *NatureCulture.* 2017;4:1-37.
56. Matsumura S, Kun Á, Ryckelynck M, et al. Transient compartmentalization of RNA replicators prevents extinction due to parasites. *Science.* 2016;354(6317):1293-1296.
57. Hayden EJ, Riley CA, Burton AS, Lehman N. RNA-directed construction of structurally complex and active ligase ribozymes through recombination. *RNA.* 2005;11(11):16781687. doi:10.1261/rna.2125305
58. Hayden EJ, Lehman N. Self-Assembly of a Group I Intron from Inactive Oligonucleotide Fragments. *Chem Biol.* 2006;13(8):909-918. doi:10.1016/j.chembiol.2006.06.014
59. Vaidya N, Manapat ML, Chen IA, Xulvi-Brunet R, Hayden EJ, Lehman N. Spontaneous network formation among cooperative RNA replicators. *Nature.* 2012;491(7422):72-

77. doi:10.1038/nature11549
60. Pressman A, Blanco C, Chen IA. The RNA world as a model system to study the origin of life. *Curr Biol*. 2015;25(19):R953-R963. doi:10.1016/j.cub.2015.06.016
61. Vaidya N, Walker SI, Lehman N. Recycling of informational units leads to selection of replicators in a prebiotic soup. *Chem Biol*. 2013;20(2):241-252. doi:10.1016/j.chembiol.2013.01.007
62. Reinhold-Hurek B, Shub DA. Self-splicing introns in tRNA genes of widely divergent bacteria. *Nature*. 1992;357(6374):173-176. doi:10.1038/357173a0
63. Fedorov A, Fedorova L. Introns: Mighty elements from the RNA world. *J Mol Evol*. 2004;59(5):718-721. doi:10.1007/s00239-004-2660-5
64. Ameta S, Arsène S, Foulon S, et al. Darwinian properties and their trade-offs in autocatalytic RNA networks. *Nat Commun*. 2021;12:842. doi:10.1038/s41467-02121000-1
65. Arsène S, Ameta S, Lehman N, Griffiths AD, Nghe P. Coupled catabolism and anabolism in autocatalytic RNA sets. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(18):9660-9666. doi:10.1093/nar/gky598
66. Coupaye L. Chaîne opératoire, transeCts et théories : quelques réflexions et suggestions sur le parcours d'une méthode Classique. In: *André Leroi-Gourhan, L'homme Tout Simplement: Mémoires et Postérité d'André Leroi-Gourhan*. Editions d. ; 2015:69-84.
67. Dupré J, O'Malley MA. Varieties of Living Things: Life at the Intersection of Lineage and Metabolism. *Philos Theory Biol*. 2009;1:e003. doi:10.3998/ptb.6959004.0001.003
68. Longo G, Mossio M. Geocentrism vs genocentrism: theories without metaphors, metaphors without theories. *Interdiscip Sci Rev*. 2020;45(3):380-405. doi:10.1080/03080188.2020.1798588
69. Mauss M. Les techniques du corps. *J Psychol*. 1936;32. doi:10.1522/cla.mam.tec
70. Fleck L. *Genèse et Développement d'un Fait Scientifique*. Paris: Les Belles Lettres; 2005.
71. Jacob F. Evolution and Tinkering. *Science*. 1977;196(4295):1161-1166.
72. Lévi-Strauss C. *La Pensée Sauvage*. Paris: Plon; 1962.
73. Hayden EJ, Von Kiedrowski G, Lehman N. Systems chemistry on ribozyme selfconstruction: Evidence for anabolic autocatalysis in a recombination network. *Angew Chemie - Int Ed*. 2008;47(44):8424-8428. doi:10.1002/anie.200802177
74. Bachelard G. *Le Nouvel Esprit Scientifique*. Paris: Presse Universitaire de France; 1934.
75. Pons M-L. Serpentinisation océanique et vie primitive. *Planet Terre*. 2014.
76. Fox SW. Synthesis of life in the lab? Defining a protoliving system. *Q Rev Biol*. 1991;66(2):181-185. doi:10.1086/417144
77. Pascal R, Pross A. A Roadmap toward Synthetic Protolife. *Synlett*. 2017;28(1):30-35. doi:10.1055/s-0036-1589403

78. Hears T. *Infravies - Le Vivant sans Frontières*. Paris: Editions du Seuil; 2019.
79. Szathmáry E, Santos M, Fernando C. Evolutionary Potential and Requirements for Minimal Protocells. *Top Curr Chem*. 2005;259(August):167-211. doi:10.1007/tcc001
80. Helmreich S, Roosth S. Life forms: A keyword entry. *Representations*. 2010;112:27-53. doi:10.1525/rep.2010.112.1.27
81. Vermeulen N, Tamminen S, Webster A. *Bio-Objects*. Ashgate.; 2012. doi:10.4324/9781315569376
82. Chrupek M, Siipi H, Martinelli L. Bio-objects as “boundary crawlers:” the case of microRNAs. *Croat Med J*. 2012;53(3):285-288. doi:10.3325/cmj.2012.53.285
83. Porcar M, Peretó J. Creating life and the media: translations and echoes. *Life Sci Soc Policy*. 2018;14(1). doi:10.1186/s40504-018-0087-9
84. Mathis C, Bhattacharya T, Walker SI. The Emergence of Life as a First-Order Phase Transition. *Astrobiology*. 2017;17(3):266-276. doi:10.1089/ast.2016.1481
85. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. 2010;329(5987):52-56. doi:10.1126/science.1190719
86. Paxson H. *The Life of Cheese*. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press; 2013.
87. Zoloth L. Second Life: Some Ethical Issues in Synthetic Biology and the Recapitulation of Evolution. In: *The Ethics of Protocells*. Cambridge: The MIT Press; 2009:143-164.
88. Hanauer DI, Sheridan CL, Englander K. Linguistic Injustice in the Writing of Research Articles in English as a Second Language: Data From Taiwanese and Mexican Researchers. *Writ Commun*. 2019;36(1):136-154. doi:10.1177/0741088318804821
89. Alogali A. World Englishes: Changing the Paradigm of Linguistic Diversity in Global Academia. *Res Soc Sci Technol*. 2018;3(1):54-73. doi:10.46303/ressat.03.01.4
90. Skoot R. *The Immortal Life of Henrietta Lacks*. New-York: Crown; 2010.
91. Cleland CE. *The Quest for an Universal Theory of Life*. Cambridge: Cambridge University Press; 2019.
92. Chodasewicz K. Evolution, reproduction and definition of life. *Theory Biosci*. 2014;133(1):39-45. doi:10.1007/s12064-013-0184-5
93. Knorr-Cetina K. *Epistemic Cultures*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press; 1999.
94. Cetina KK. Culture in global knowledge societies: Knowledge cultures and epistemic cultures. *Interdiscip Sci Rev*. 2007;32(4):361-375. doi:10.1179/030801807X163571
95. Mead M. Socialization and Enculturation by Margaret. *Curr Anthropol*. 1963;4(2):184-188.

96. Reinhold-Hurek B, Hurek T, Gillis M, et al. Azoarcus gen. nov., nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1993;43(3):574-584. doi:10.1099/00207713-43-3-574
97. Avenas P. *La Prodigieuse Histoire Du Nom Des Éléments*. Les Ulis: edp sciences; 2018.
98. Lavoisier A, Guyton-Morveau LB, Bertholet C-L, Fourcoy A-F, Hassenfratz J-H, Adet PA. *Méthode de Nomenclature Chimique*. Cuchet. Paris; 1787.
99. Malaterre C, Chartier J-F. Beyond categorical definitions of life: a data-driven approach to assessing liveness. *Synthese.* 2019;198:4543-4572. doi:10.1007/s11229019-02356-w
100. MacLeod N. Images, Totems, Types and Memes: Perspectives on an Iconological Mimetics. *Cult Theory Crit.* 2009;50(2-3):185-208. doi:10.1080/14735780903240125
101. Chu D, Ho WK. A Category Theoretical Argument against the Possibility of Artificial Life: Robert Rosen's Central Proof Revisited. *Artif Life.* 2006;13:369-381.
102. Ray TS. An Evolutionary Approach to Synthetic Biology: Zen and the Art of Creating Life. *Artif Life.* 1994;1(1_2):179-209. doi:10.1162/artl.1993.1.1_2.179
103. Pitrou P. La vie, un objet pour l'anthropologie ? *L'Homme.* 2014;4(212):159-189.
104. Wittgenstein L. *Philosophische Untersuchungen*. G.E.M Anscombe, Rush Rhees; 1953.
105. Helmreich S. What was life? Answers from three limit biologies. *Crit Inq.* 2011;37(4):671-696. doi:10.1086/660987
106. Gérard S. Estelle Ferrarese & Sandra Laugier, eds, *Formes de vie*. *L'Homme.* 2019;(230):192-194. doi:10.4000/lhomme.34166

4. The origin of life in microfluidic protocells

This chapter brings together the ethnographic description of the production and analysis of microfluidic protocells by researchers in the laboratory (part 4.1) and the scientific rendering of the results that are derived from them (part 4.2). These protocells correspond to water droplets in oil that grow and divide in competition with each other. Part 4.1 draws its value from revealing elements that are absent from the final scientific restitution, thus allowing a juxtaposition between the context of discovery and the context of justification. When part 4.2 describes a settled and ordered knowledge, the ethnographic description aims at transcribing the tortuous path, as much materially as conceptually, that is taken to arrive at this result. The emphasis is on the technical gestures and interpretations of the experiences, before the final writing process of which part 4.2 is the outcome.

Part 4.1 is adapted from:

Jeancolas, C. ‘Modelling the transition from the inert to the living’, *Techniques & Culture* [En ligne], 2020, suppléments au n°73, Translation: Benjamin Ivry, <https://journals.openedition.org/tc/14086> For the French original version, see:

Jeancolas, C. ‘Modéliser la transition de l’inerte au vivant’, *Techniques & Culture* [En ligne], 2020, suppléments au n°73, <http://journals.openedition.org/tc/13902>

Part 4.2 is the adaptation of a submitted paper interdisciplinary scientific journal and coauthored with Heng Lu, Alex Blokhuis, Rebecca Turk-MacLeod, Gabrielle Woronoff, Afshin Abrishamkar, Fabien Ferrage, Philippe Peluassy, Ludovic Jullien, Eörs Szathmary, Philippe Nghe and Andrew. D. Griffiths.

4.1. Making and interpreting microfluidic protocells

In origin-of-life studies, the boundary between non-living and living things is conceived as gradual and there are entities with varying degrees of aliveness. In order to explore this transition, researchers at the Laboratory of Biochemistry of ESPCI Paris are building prototypes of living systems that are supposed to progress towards life. These artefacts, which I propose to call “protolives”, embody their creators' conceptions of life and influence them in return by the manifestation of their properties, interweaving technical and life processes. One project in particular involves the technique of droplet microfluidics to develop a protolife engaged in experimental modelling of the transition from non-living to living. By producing microscopic water droplets assimilated to protocells, the researchers are mimicking biological cells. The establishment of an interconnected population of these drops in a dynamic of natural selection then leads to a modelling of life according to the selected criteria. As the technical assemblies, empirical results, analyses and discussions progress, the researchers perceive an increase in the degree of aliveness of their artefacts in a constant exercise of interpreting the emerging properties of the system.

4.1.1. Ethnographic extract

The water droplets have been incubating in the microfluidic chip for three hours now. On his desktop screen connected remotely to the microscope, the experimenter notes that their volume no longer varies. Two populations can be clearly distinguished: large droplets and small droplets. He looks at his colleague, anxious but determined, who immediately understands when he sees the screen. He knows that they have to do a particularly delicate but essential manipulation for their experimental modeling. These droplets are intended to mimic rudimentary cells. Now that they have caused them to grow differentially, they must selectively divide them. Such an experiment would be the modeling of a stage in the appearance of life. The two researchers get up and go to the microfluidic room. As usual, it is plunged into darkness and only a halo of light makes it possible to distinguish the bench in front of which they are positioned. One of them cuts sections of a plastic tube wound into a coil and the other inserts them into a pressure generator. The latter contains the liquids to be injected into the microfluidic chip to move the droplets from one chip to another.

Connecting the generator and the chip, then the chips between them, is a particularly delicate operation. Each gesture must be surgically precise, otherwise the droplets will be lost and a long experiment, already failed several times, will be destroyed. One of the two researchers positions himself in front of the microscope, with a tube in hand, his colleague varies the pressure of the generator on the screen. The same pattern is then repeated as many times as there are tubes to connect. "Go ahead." The pressure is turned on. Absolute silence. "Stop". The pressure is cut off. The silence accompanies a palpable anxiety as the researcher inserts the pipe into the chip. When all the pipes are connected, the tension does not go down, on the contrary. The two operators will now proceed to the selective division step. Playing on the

pressures of the fluids to be injected, they want to make the droplets pass through a T-shaped junction in a chip. By crossing it, the large droplets should divide, not the small ones, which would evoke in their eyes the emergence of a natural selection. However, if the speed of the droplets is too low, none of them divide; and if it is too high, they all divide. Moreover, the speed must be compatible with the frequency of the images captured by the microscope camera. In recent weeks, the researchers have repeatedly consumed all of the droplets before reaching the expected speed, causing this careful manipulation to fail.

Today's experiment looks like a last chance operation, as they are tired of the lack of results. One of the two researchers starts and activates the pressure. On the screen, we can see the droplets coming out of the first chip and going into the connecting pipe. It must be done quickly. The second researcher moves the second chip under the microscope and adjusts the lens. On the screen, they see the image of the T-junction of the chip. Suddenly, a surge of droplets passes through it. "Slow down, slow down, slow down!" The first researcher immediately cuts off the pressure and thus preserves the precious stock of droplets that have incubated. "Go up, slowly. More, more, more. Hold on. More, more. Down, down..." The droplets scroll across the screen. The two collaborators are increasingly tense and fear another failure. However, after a few intense minutes, they witness the long-awaited spectacle. Only the largest droplets split up and the selection is clearly visible on the screen. One of them hastily records a few seconds of video and plays it back twice. They then look at each other with a smile. "That's it! That's it, we did it!" They clap their hands in victory then relax with sighs of relief. After several weeks of repeated failures, their goal is finally achieved.

The intensity of the experiment can only be understood in the light of what these droplets represent for these researchers. They are not simple droplets of water but real prototypes of living being: protolives.

4.1.2. Context

“We have found the secret of life!” With this phrase resounding in a Cambridge, UK pub in February 1953, Francis Crick publicly announced the discovery of DNA structure.¹ That same year, a lesser-known discovery confirmed the ambitions of scientists to push the mysteries of living things even further. By simulating a primitive terrestrial atmosphere in his Chicago laboratory, Stanley Miller synthesized elementary molecules of living things in the absence of any biological process. In doing so,² he responded to an injunction from 40 years before by biologist Jacques Loeb: “We must either succeed in producing living matter artificially, or we must find the reasons why this is impossible.”³ The race to make life in laboratory was on; some research teams multiplied and followed one another in the scientific world, leaving behind hybrid objects, not quite alive, not quite inert. The Laboratory of Biochemistry of the City of Paris Industrial Physics and Chemistry Higher Educational Institution (*École supérieure de physique et de chimie industrielles de la Ville de Paris*; ESPCI), which constitutes my field of ethnographic investigation, makes up part of this ambition.

The laboratory focuses in part on empirical and theoretical modellings of the transition from the inert to the living in a perspective of research on the origins of life. It has around thirty researchers with varied backgrounds. Biologists, chemists, physicists, experimenters and theorists collaborate to study living organisms at molecular levels from fundamental and applied

perspectives. Most use and develop the rapidly expanding technique of droplet microfluidics. It consists of massive production of water droplets of micrometric size emulsified in synthetic oil, generating thousands of microcompartments within a few minutes (Figure 1). These droplets are produced using microfluidic chips a few centimeters in length (Figure 2). They are made of microchannels etched into a material forming a microfluidic circuit, into which different immiscible liquids (water and oil) are injected to generate, circulate, and manipulate droplets. Lab researchers use these droplets to test biochemical reactions in the thousands for high throughput analyses. In the Chemfit (Chemical Fitness) project, the subject of this ethnography, these droplets are used to mimic biological cells, with the aim of experimentally modelling a possible stage in the appearance of life, a process which remains a mystery for scientists.

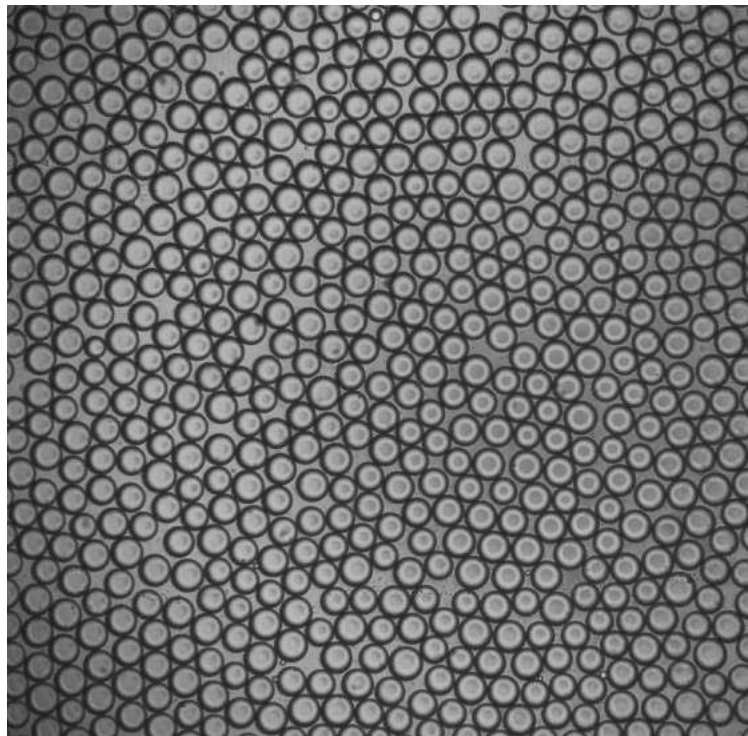


Figure 19 Water droplets in a microfluidic chip. The researcher displays this image in real time on a computer situated next to the microscope.

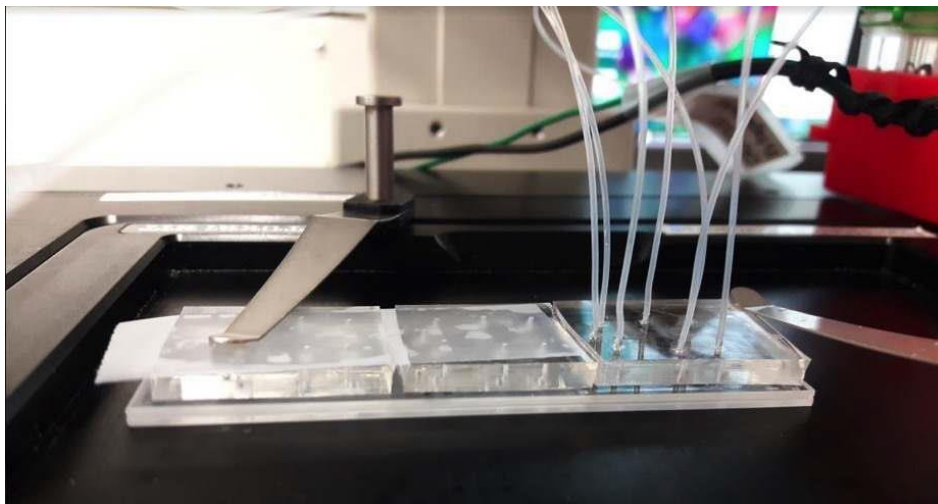


Figure 20 Microfluidic chip placed under a microscope. The experimenter connects it with hoses to inject different fluids into it. As a result of the convergence of liquids, the droplets increase rapidly in the circuit engraved within. For a photo of the circuit, see figure 10.

This modelling is the construction of an empirical system meant to share properties with a phenomenon, which by its realization will make the latter more intelligible. Since the phenomenon in question is the origin of life, the result is an epistemological and pragmatic problem. There is currently no scientific consensus on the definition of life.⁴ Most of the time, researchers establish or use definitions defending systems for explaining life processes perceived as such, or theories of life⁵ competing with one another. However, it is widely accepted by scientists that no current definition or theory of life allows us to characterize the phenomenon in its entirety. How then can we consider modelling something that we still cannot define? What are the conceptions of life integrated by Laboratory of Biochemistry researchers into this modelling? Is there a reciprocal influence between experimental techniques used, empirical results and theories of life employed? I will begin by detailing what conceptions of living things are supported by scientists, which influence choices of techniques used, as well as the artifacts synthesized. I will proceed to describe techniques used to create and analyze microfluidic droplets designed to mimic living things at the cellular level. I will then demonstrate how researchers integrate these droplets into environments and dynamics to modelling life. I will conclude by highlighting the circularity between theories of life and techniques of imitation and modelling, leading to a regular reformulation of the categories in question.

I distinguish between the living (*le vivant*) and life (*la vie*). The first corresponds to all living beings, material objects that support life. Life, by contrast, is the set of efficient causes that keep living beings in existence. Therefore, I propose to speak of imitation of living things to designate the production of objects meant to exhibit properties observed in living beings. On the other hand, I speak of modelling of life to refer to establishing a system that reproduces an environment in which conditions are created to bring about and maintain living beings in existence. In this sense, the production of microfluidic droplets is seen as an imitation of living things - in this case, an imitation of cells - while their manipulation in microfluidic chips consists of a modelling of life.¹ This is the heuristic hypothesis based upon which I wish to describe the relevant practices observed at the Laboratory of Biochemistry.

I am both participant and observer of most of the events I will describe (for a detailed example of laboratory ethnography and participant observation, see⁶). The participant observation that I present in this article is therefore an analysis of the anthropology of science executed by a

¹ This increase in integration, when passing from imitation to modelling can be linked to the following definitions. Imitation is the act of "reproducing through one's art the appearances and forms of real objects taken as models" (Gautier, *Bovarysme*, 1902, p. 168). Modeling is the act of producing an "artificial system whose properties are similar to the observed or inferred properties of a system under study, and whose behavior is intended either to reveal behaviors of the original that are likely to be the subject of new investigations, or to test the extent to which the properties attributed to the original can account for its manifest behavior" (Thinès-Lempereur 1975). According to the Centre Nationale de Ressources Textuelles et Lexicales (<https://www.cnrtl.fr> consulted on July 07, 2021). For precision, the modellings discussed here are not mathematical modellings which are encountered in other chapters.

scientist discovering anthropology, and not by an anthropologist discovering natural science, a more frequent phenomenon. This foray by the anthropology of science into a laboratory working on the origins of life meets a demand by some scientists in the field, who believe that it is necessary and urgent to study their practices with, and conceptions of, the living.⁷ My approach belongs to the convergence of the anthropology of techniques and the anthropology of life, aiming to account for differences in conceptions of life in societies across time and space.⁸ Techniques are proving to be privileged vehicles for studying theories of the life of those who use them, as demonstrated by the work of Ludovic Coupaye in Papua, employing the operational chain (*chaîne opératoire*) to reveal an interweaving of technical processes and life processes in cultivating yams, assimilated to “growing artefacts”.⁹ Conceiving living things through the prism of making is found in traditional, as well as technoscientific, societies. Ethnographic investigations performed by Sophia Roosth in a synthetic biology laboratory¹⁰ concur with those done by Perig Pitrou among the Mixes of the Oaxaca region of Mexico, for whom the birth of a child is comparable to the firing of a pottery artefact.¹¹ Similarities between making and growing objects, specifically detailed by Elizabeth Hallam and Tim Ingold,¹² appear to support the application of tools from the anthropology of techniques and the anthropology of life in the Laboratory of Biochemistry, where life is a matter of making. In such an enterprise of imitating living things and modelling life, the assembly of properties selected for epistemological and pragmatic reasons results in fabricating entities situated somewhere between the inert and the living.

4.1.3. Origins of life and making of artefacts

In origins-of-life studies, the distinction between the inert and the living is continuous, rather than discreet. It is imagined as a more or less tortuous branched path, along which it is theoretically possible to establish a degree of aliveness scale, codified in the terms “aliveness” and “liveness”.^{13,14} Therefore, entities manufactured or imagined between the two poles of the inert and the living have a more or less strong degree of aliveness. In this sense, some objects may be more alive than others. But this type of degree of aliveness scale is rarely conceived in a single dimension. It is more like a tremendous complex bush, in which “a living being cannot lack anything, if one accepts that there are a thousand and one ways of living,” as pointed out by Georges Canguilhem.¹⁵ To explore this space of the degree of aliveness, the Laboratory of Biochemistry researchers opt for a synthetic, rather than historical, approach. That is, they do not claim to provide answers about the historical origin of life as we know it, but seek to fabricate artefacts that could model a universal transition from the inert to the living. This synthetic approach is often found in synthetic biology, in which living things are constantly reconstructed to be understood, and where Richard Feynman's maxim, “What I cannot create, I do not understand,” is frequently repeated.

In this approach, the concept of “materialized theory”¹⁶ assumes a full meaning. Artefacts produced in the laboratory to bridge the gap between the inert and the living embody theories of life presupposed, explicitly or not, by their designers. The weight of epistemological culture of relevant researchers is therefore considerable.^{17,18} A different theory of life will duly result in

a different artefact, which I propose to term *protolife* (for other uses of this term see^{19,20}). The prefix “proto” refers to the notion of prototype as much in its technological sense of the “first real modelling of an object, of a machine, established in order to develop it before undertaking mass production” than in its biological acceptance of “primitive form to which we can trace later forms”.²¹ In the use I make of it, protolife is therefore the result of the manufacture of a prototype designed to be part of a gradual appearance of life. Note that the concept of *infralives* (*infravies*) developed by Thomas Heams in *Infralives: The Living without Borders (Infravies – Le vivant sans frontières)* differs.²² It refers to all real or imaginary, natural or man-made entities situated between the inert and the living, including protolives but characterizing a larger group. Protolives are indeed artificial prototypes that are incorporated in a rise of the degree of aliveness, according to the theories of life of their designers. The notion of *infralife* does not characterize this prototyping, which is specific to research on the transition from the non-living to the living.

In the Laboratory of Biochemistry, manufactured protolives are vectors of theories of life of their designers who usually define a living being as “a self-sustaining chemical systems capable of Darwinian evolution” (the definition officially adopted by NASA).²³ The same researchers define Darwinian evolution as a combination of reproduction with inheritance, variation, and selection.²⁴ This definition of life has weaknesses and they are aware of its limits. They do not claim to use a definition that captures the true nature of things. This is a “working definitions,” designed as a heuristic to facilitate the researcher’s task. Its use greatly influence the nature of protolives produced in the laboratory, which in turn may influence the underlying theories. As the aforementioned definition of life accords a key role to Darwinian evolution, Chemfit project scientists leapt to the conclusion that to generate life, one must generate evolution (unless otherwise specified, the term “evolution” as used here implies Darwinian evolution). Their goal or “Holy Grail” to use a term many times pronounced, is the emergence of such an evolution. In this project, the handling of microfluidic droplets is entirely devoted to this objective. This approach is a stance assumed in the heterogeneous field of research on the origins of life. Without questioning the importance of evolutionary mechanisms in the functioning of living things, other scientists do not think that evolution was a founding principle of the emergence of life.²⁵ In this sense, the droplets experiments created at the Laboratory of Biochemistry reveal a theory about the origins of life, and therefore about life itself.

4.1.4. Imitating cells, making protocells

Described for the first time in 1665 by Robert Hooke in *Micrographia*,²⁶ the cell (Figure 3) is recognized within the framework of cell theory as the elementary unit of living beings, whether they are single-cellular like bacteria or multicellular, like humans. These cells share common characteristics of being micrometric-sized compartments, delimited by a lipid membrane and possessing genetic information. They all work in much the same way, but their different specializations reflect the phenomenal diversity of the biosphere and the organs of a single living being, due to varying genetic expression.

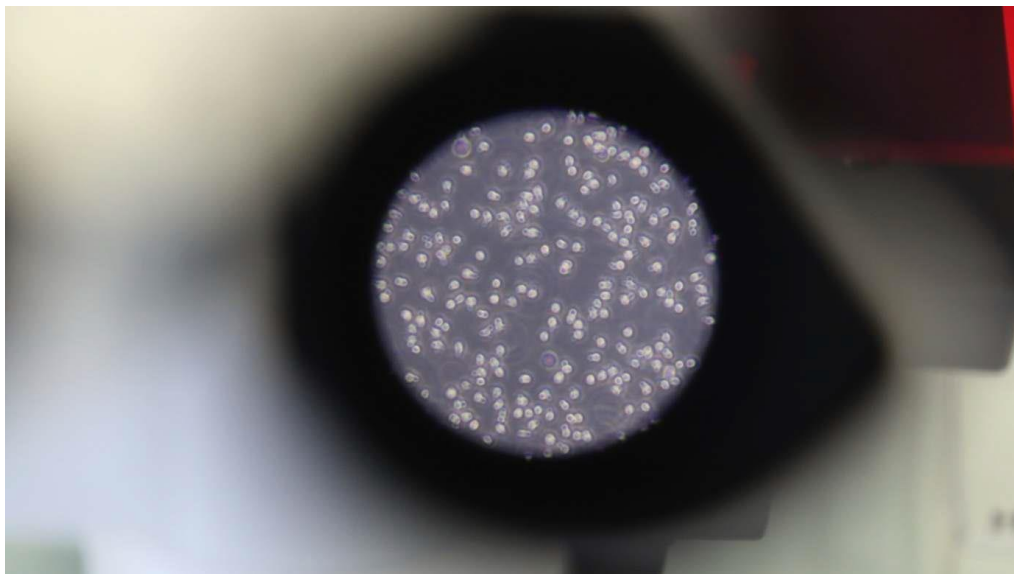


Figure 21 Cells in direct visualization under a microscope. Cell culture and protocellular culture, present together at the Laboratory of Biochemistry.

Cell theory generally proceeds in pace with the principle of biogenesis, according to which a cell can only come from another cell. This principle stated by Rudolf Virchow (“*Omnis cellula e cellula*”)²⁷ remains highly influential among biologists. Still, researchers working on the question of the origins of life must overcome this postulate. Indeed, one of the objectives displayed in this field of research is abiogenesis, or the spontaneous gradual emergence of a cell or population of cells without the intervention of already preexisting cells. However, in the Chemfit project, the appearance of an evolutionary dynamic between these cells, conceived as a necessary stage in the emergence of life, is of great interest to researchers rather than the appearance of those cells. And for good reason, insofar as the pH is so high in the microfluidic system that no known living thing could survive in it. Nevertheless, the language of biology is omnipresent. Objects and processes which are not biological are called genome, metabolism, cell, and species. Mostly they are associated with the prefix "proto," which is essential because it indicates that the artifacts are not biological, but that they tend to be, in the manner of the aforementioned prototype. Researchers refer to the droplets as "protocells," a term found in many other experiments aimed at mimicking how cells work.²⁸ These protocells have a double ontology. They are imitations because scientists reproduce properties in these objects which are observed in cells; but they are also prototypes because they are part of a technological or natural evolution towards more mature cells, or more faithful copies.

To generate and manipulate microfluidic droplets, the experimenter has only pressure forces. He places small plastic containers of water or oil solution into a pressure generator, then inserts small-diameter plastic pipes into them. Using a computer connected to the generator, he can change the pressure placed on each tube. The greater the pressure, the faster the liquid in the tube passes through the pipe connected to the tube. The researcher then connects the other end of the pipe to the opening of a duct cut into a microfluidic chip, inserting it into a pre-drilled hole (Figures 4 and 5). Once the pressures are activated, the liquids flow through the ducts of

the chip. Acute pressure adjustment and circuit geometry lead to constant eruption of water droplets in an oil solution. When the microfluidic chip is placed under a microscope, the experimenter may observe the circuit flow of fluids and droplet formation in real time on a screen (Figure 6, video 1). All droplets are generated this way, regardless of their utilization.

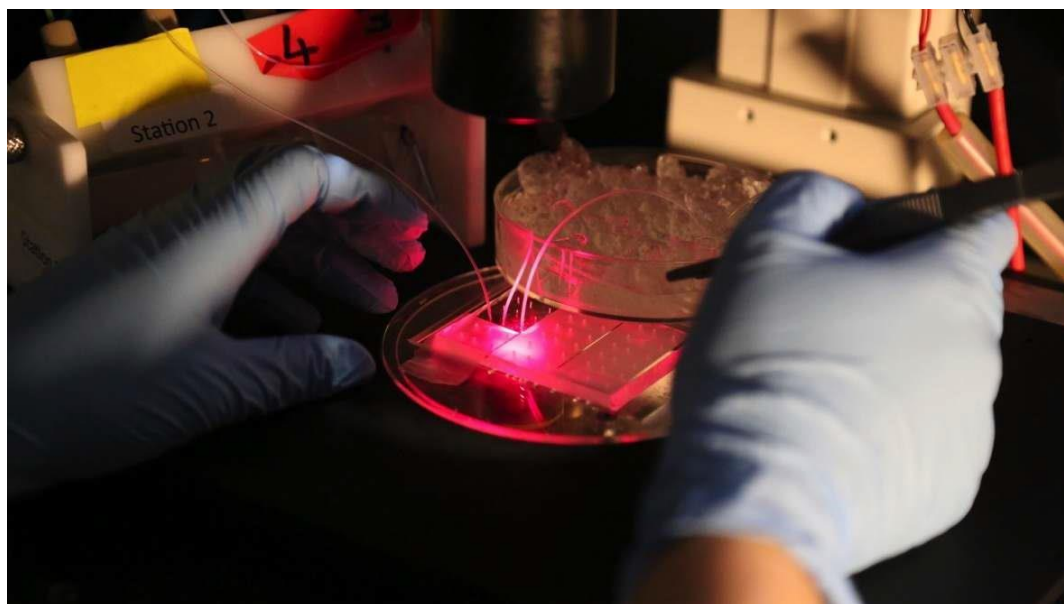


Figure 22 The experimenter prepares the microfluidic device. He inserts the plastic pipes at the opening and discharge points of the microfluidic circuit.

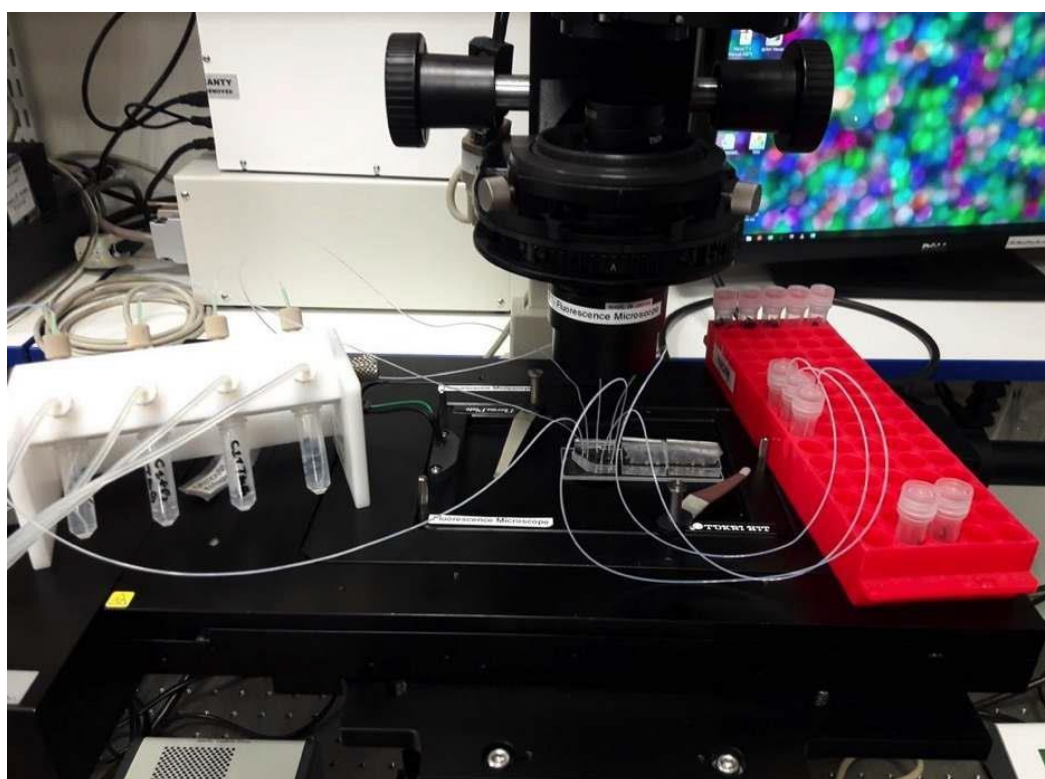


Figure 23 Complete microfluidic device. The experimenter connected the microfluidic chip (center) with a pressure generator (left) through plastic pipes to circulate different solutions. Other pipes connect the chip to receptacle tubes (right).

The simple fact of being a liquid compartment is the most obvious property that unites droplets and cells from the researcher's perspective. Compartmentalization is indeed the most substantial attribute of the cell, which even derives its name from this aspect, with the Latin word "cellula" meaning "small room".¹ Depending on the circuit geometry and pressures exerted, the experimenter can vary the size of droplets, which are slightly larger than a biological cell. The interior of these compartments is filled with liquid water, an element of paramount importance for all living beings on Earth, and which remains the primary attribute sought by astrophysicists looking for habitable exoplanets.²⁹ Now let us look at the boundaries of these compartments. When preparing solutions, the scientist mixes oil with a surfactant. The surfactant stabilizes the droplets, so that they do not merge with each other. It is composed of amphiphilic molecules, in that one end of the molecule is hydrophobic, while the other is hydrophilic. The lipids making up cell membranes have the identical characteristic. The droplet surface is coated with a surfactant, as with all known cells. These droplets delimit in space a compartment with fixed, but not insurmountable, borders. Indeed, depending on the environment, the droplets are semipermeable. They only allow certain molecules to pass, permitting a selective back and forth between the interior and exterior environment. This characteristic is found in all cells which cannot survive without controlled exchange with the external environment.

As a result, microfluidic droplets are semipermeable compartments, filled with water and lined with amphiphilic molecules, properties shared with all cells of the known biological world. However, these characters were not initially integrated into droplet microfluidics for the purpose of imitating cells. These properties result either directly from technical requirements or from fortuitous side effects such as semipermeability. The latter often represents a handicap and is considered as a limit of the technology in common microfluidic experiments, because it induces leakage of certain compounds from the droplet to the external environment. A posteriori, researchers seized the opportunity presented by this technique to deliberately imitate cells and speak of protocells. Chemfit project scientists adhere to this approach. To better understand this semipermeability, they created a series of experiments to isolate this property from living things. By adjusting pressures of liquids in a chip, the experimenter lines up droplets of different compositions side by side and studies the diffusion of molecules from one droplet to another. The droplets become smaller or larger, depending on greater or lesser diffusion of the molecules between them; this is an osmosis phenomenon. In other words, some droplets absorb water from others (Figure 7). By calculating the variations in droplet volumes under a microscope, the researcher determines the parameters of semipermeability. This type of experiment isolates a unique property of living things for further study.

¹ It is worth mentioning that yet Hooke chose the name "cell" in reference to beehive's cells.²⁶

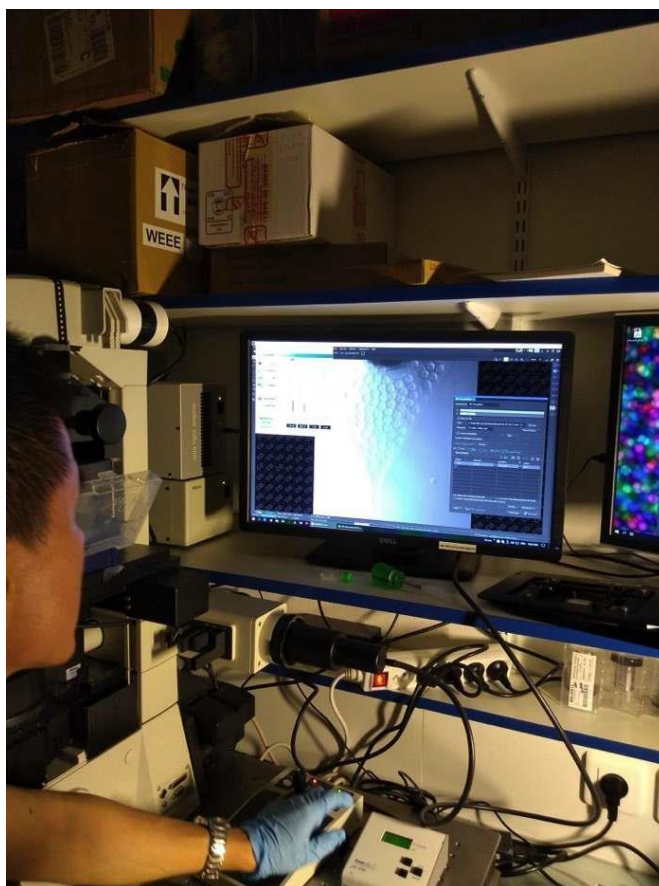


Figure 24 Microfluidic experiment control screen. During microfluidic manipulations, the researcher has a direct view of the chip on a screen connected to the microscope.



Video 1. Formation of water droplets in a microfluidic chip. See <https://vimeo.com/396910891>. By injecting oil and water into different channels of the microfluidic circuit, the experimenter can witness the formation of droplets in real time, on the screen connected to the microscope. In the video, motion is slowed by 200 times.

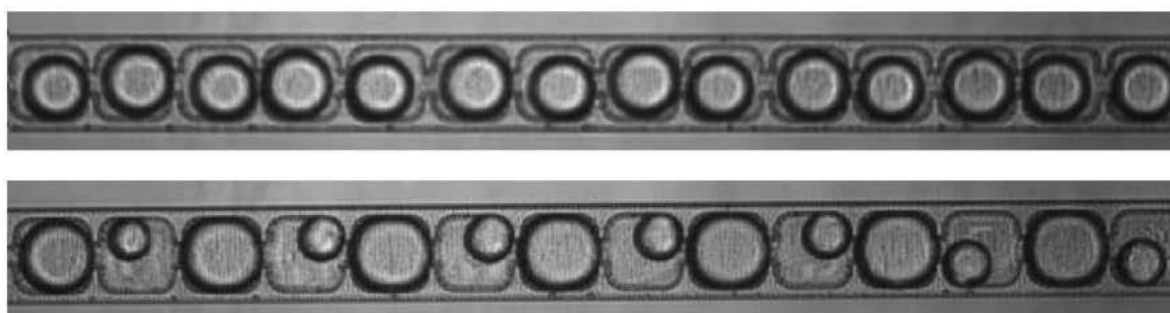


Figure 25 Water droplets placed in a microfluidic chip. Experiment showing variation of the volumes of droplets having alternately different chemical compositions. Above: start of the

experiment. Below: end of the experiment (after a few hours). In the microfluidic room, researchers extract and analyze the semipermeability life property.

Chemical reactions that occur in biological cells are intrinsic properties of living things. But in the preliminary experiments described so far, such reactions have not been discussed. The droplets only differ in their concentration of certain molecules, which induces a difference in size by absorption of water. This difference in concentration can be attained if some droplets have reagents and others do not. The resulting chemical reaction, in some droplets only, induces a difference in concentration and, ultimately, a difference in size through the phenomenon of osmosis. Part of the modelling of the project is to encapsulate such reactions in droplets. However, just as with semipermeability, researchers are undertaking preliminary experiments to isolate and study this other property of living organisms before encapsulation. To ascertain concentrations and optimal conditions for preparing this reaction and its evolution over time, they study parallel examples in solution in tubes, with a total absence of droplets (Figure 8). This chemical reaction is so essential to the project that it is commonly called "the formose project" by laboratory personnel after the name of the reaction employed.¹ This effect has the advantage of exhibiting properties common to cell metabolism, sometimes referred to as "protometabolism." During the reaction, small molecules unite to form longer ones, which then break down into small reactive molecules. The cycle of reactions thus formed is said to be autocatalytic, and is also considered an essential characteristic of living beings.

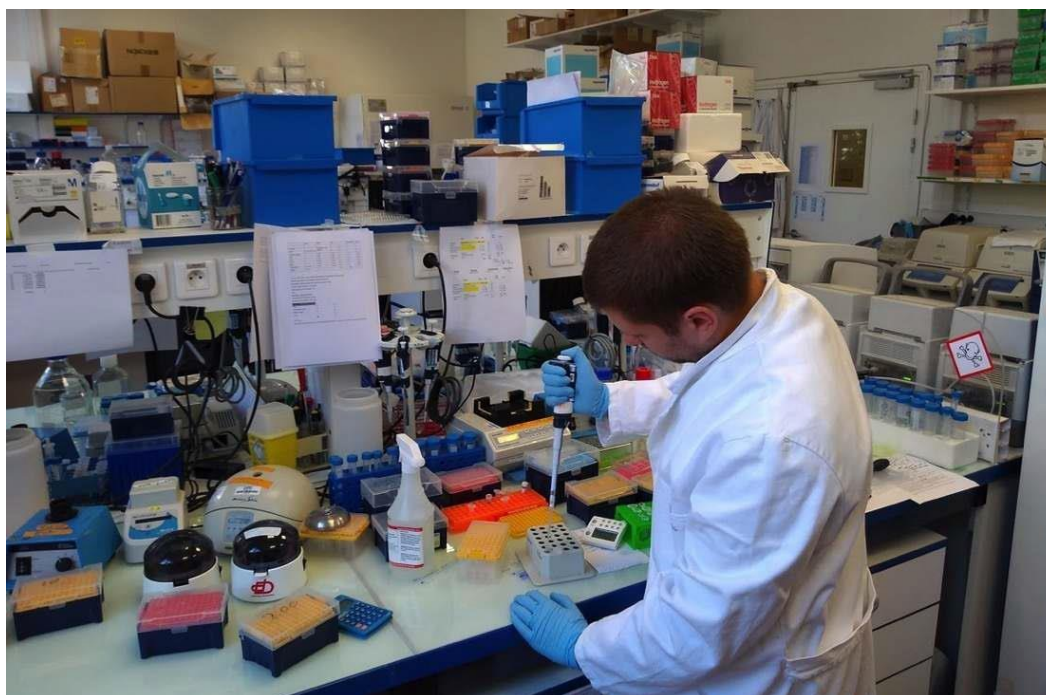


Figure 26 Researcher working at the biochemistry bench. As part of the Chemfit project, the experimenter prepares solutions and studies chemical reactions to be integrated into protocells. In this room, he extracts and analyzes metabolic and chemical life properties.

¹ A name like « droplet project » would not fit since most of the lab projects use droplets.

Experiments of semipermeability in droplets and chemical reactivity in tubes, which do not take place in the same room, isolate two life properties which will then be merged into a cell imitation. This way of proceeding presupposes the autonomy of these two characteristics of living things that researchers can assemble in an attempt to construct it.

4.1.5. Modelling the environment, modelling life

The protocell, reduced here to a chemical reaction compartmentalized in a droplet, is just the starting point for a modelling of life and its appearance in the laboratory. The droplet is not considered by itself, but within a population dynamic integrated into a medium formed by the microfluidic chip. It provides essential structure and agency for the evolution of droplets. Indeed, the circuit geometry determines the formation of droplets, their size, and future. Most of the time, the chip is planned, built, and used by researchers themselves. Initially, they draw the circuit wanted by using an architecture software. They assume the role of architects by designing environmental plans for future droplets, to make them appear, grow, and multiply. After the plan is completed, they sent it to a company which returns a template in the form of a plastic film on which is printed a negative of the circuit, allowing them to engrave it on a substance by photolithography (Figure 9). As manufactured chips are often disposable, templates are the storage forms of microfluidic circuits, which may be found in laboratory storages. Each template corresponds to a circuit, and each circuit is linked to a life within the framework of the Chemfit project. So there is a circuit to make the droplets appear, another to incubate them, and another to divide them. During modelling, the experimenter will convey droplets from one circuit to another through the aforementioned plastic pipes. To manufacture a circuit in a chip, a relevant template is chosen, and individual chips are created by following a predefined protocol at the microfabrication platform. Once the chip has been manufactured, and after chemical treatment, it is ready to be handled under a microscope (Figure. 10).

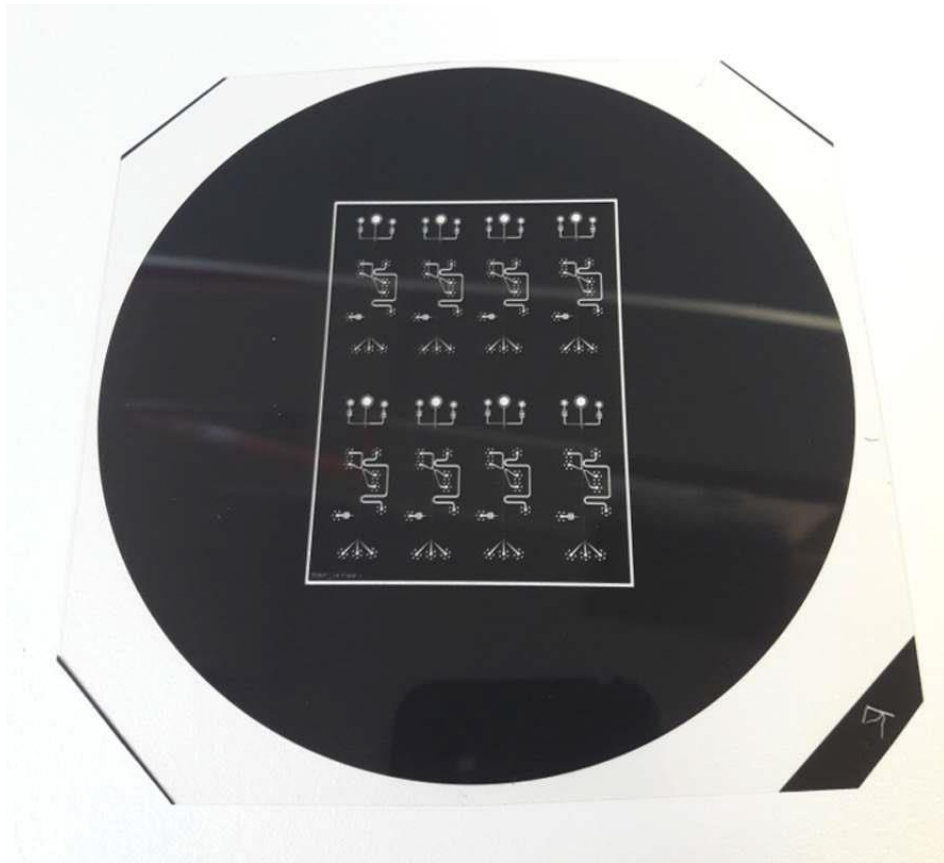


Figure 27 Template showing a negative image of a series of microfluidic circuits. These indexed templates are the vehicles for exchanging and storing circuits.

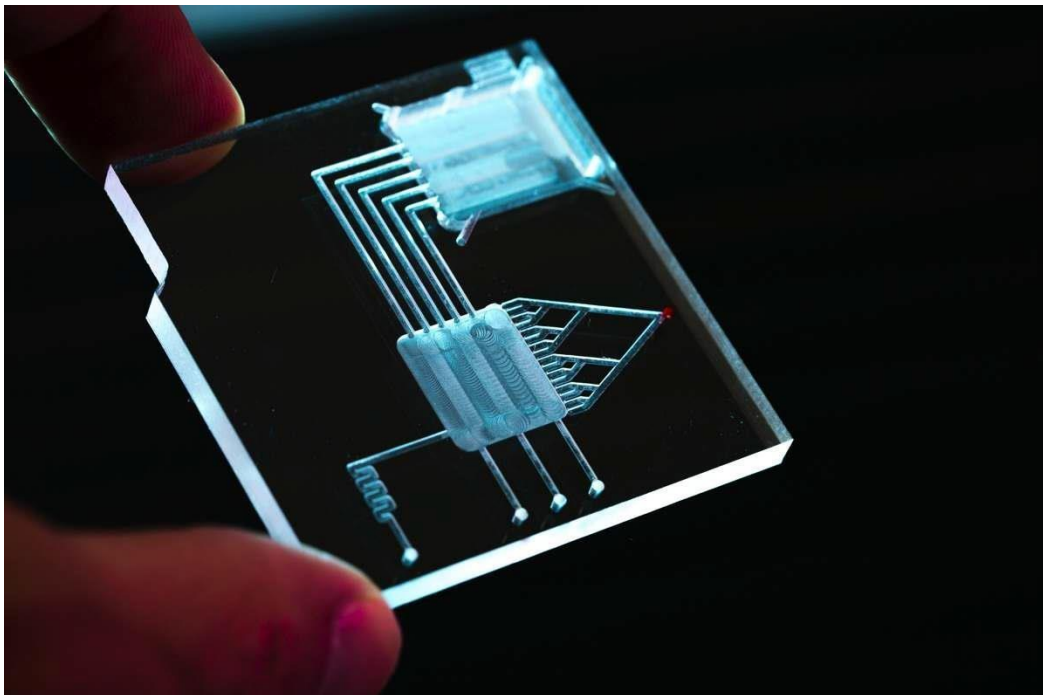


Figure 28 A microfluidic circuit engraved in a chip (Adobe Stock).

The use of the chip makes it possible to carry out modelling experiments on a population of interacting droplets in which researchers provide an evolution conceived on the scale of the

population, rather than the individual. In this modelling, two populations of droplets with slightly distinct chemical compositions are produced. To use the vocabulary employed in the project, I will talk about “efficient” and “inefficient” droplets. I will detail the highly significant choice of these words later. The efficient droplets have all the necessary ingredients to support the aforementioned formose reaction. The inefficient ones are deficient in one ingredient, preventing them from initiating this reaction. After generating the two populations of droplets and using pipes, the experimenter passes them through another chip with a large space where they can lie alongside on another in two dimensions. After an incubation period of a few hours, the efficient droplets grew larger while the inefficient ones became smaller. Due to the chemical reaction taking place within them, the former sucked the water constituting the latter up (Figure 11, Video 2). Final droplet size depends on their proximity to other droplets. An efficient droplet in contact with six inefficient droplets becomes larger than if it is next to a single one. These neighbourhood microenvironments induce their future variability.

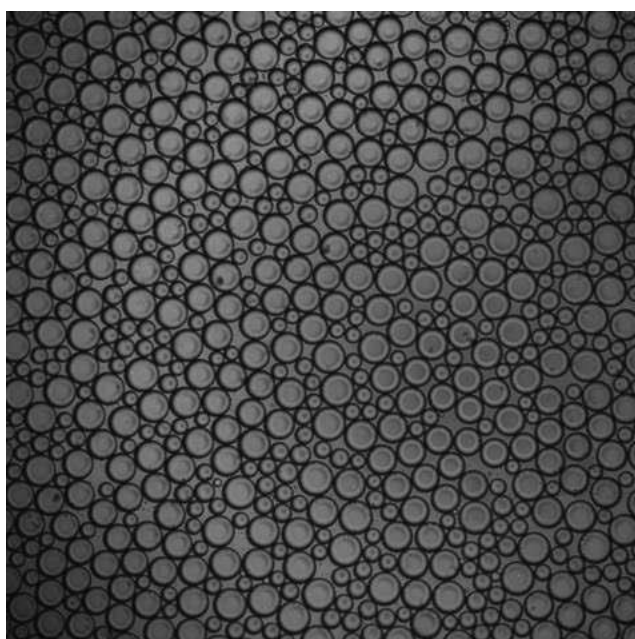
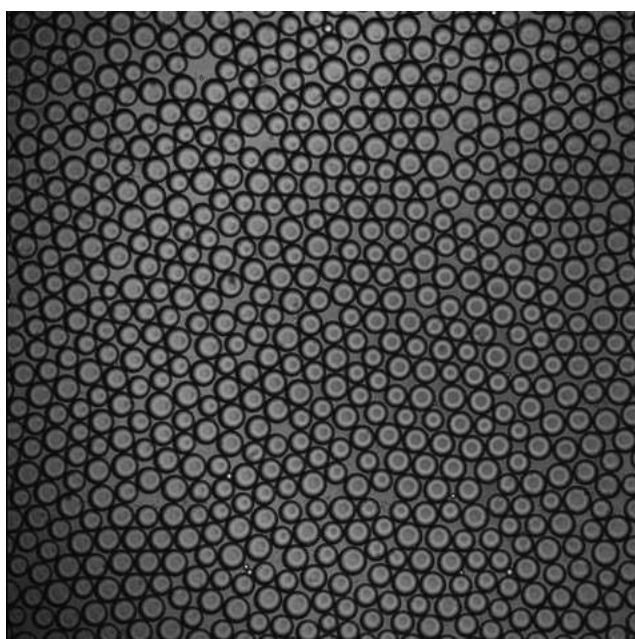


Figure 29 Microscopic images of a population of droplets in a chip, before and after incubation. In this experiment lasting a few hours, one population of droplets expands at the expense of the other, which shrinks. **Video 2.** Differential growth of water droplets in a microfluidic chip. See: <https://vimeo.com/396911595>. Droplets which contain all necessary ingredients for creating the formose reaction suck water up from the droplets lacking it. The video's motion is sped up 120 times (actual duration of two hours).

After a few hours of incubation, the microfluidic chip is filled with droplets that have increased or diminished. In the modelling process, the researcher then proceeds to the step of selective division. Droplets are conveyed to a new chip with a T-shaped junction in its circuit (Figure 12). The geometry of this junction is such that only droplets that have reached a sufficiently large size will bisect when passing through this circuit. Droplets under this size collide, but do not divide (Video 3). As a result, this passage induces doubling of the efficient droplets, compared to the inefficient ones. In short, because one population of droplets has a different chemical composition, it sucks water up from another population; this aspiration increases the volume of individuals, multiplying at the expense of the other population. Selective division emphasizes the agentive nature of the environment. Indeed, a population of specific droplets in a specific environment results in division. In a way, the function of cell division is externalized to the environmental level, further blurring individual boundaries.

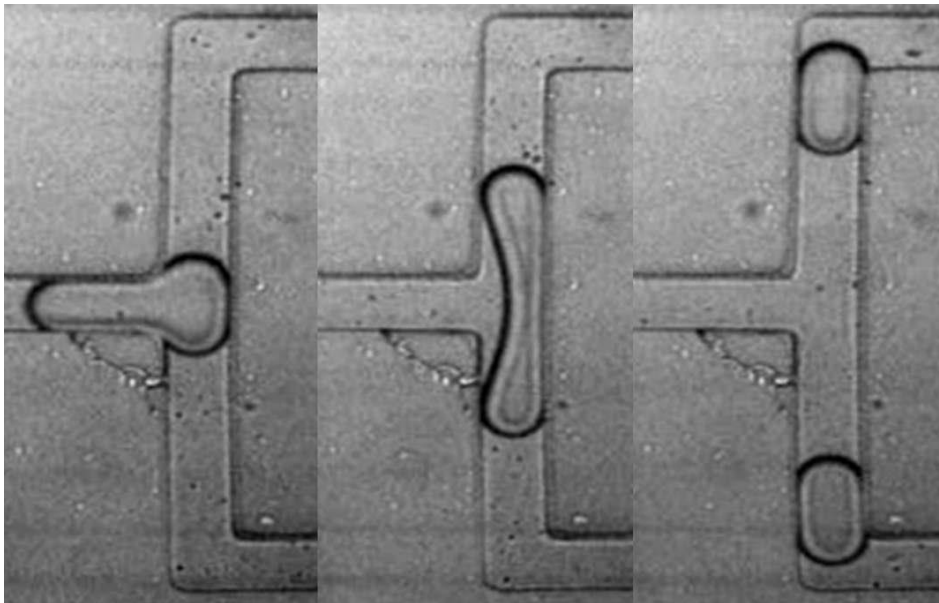


Figure 30 Three microscopic images showing division of a droplet across a T junction. The droplet is propelled from left to right and only divides if it has reached a minimum volume. **Video 3.** Selective division of water droplets across a T-junction. See: <https://vimeo.com/396912176>. By traversing T-junctions in a microfluidic chip, only droplets reaching a sufficient size will divide. Researchers interpret this as the emergence as being part of a natural selection. Real time.

After the division is accomplished, the researcher collects all the droplets at the point of discharge to perform what is termed a "second round." This is done to inject a new population of inefficient droplets. During a new incubation, efficient droplets from the division once again pump water from the new arrivals and their volumes increase again upon contact. By passing them back through a T-shaped junction, the experimenter can reproduce the result and maintain protocellular reproduction over time. But for technical reasons, the experiment was not carried on beyond the second round. The association of periods of growth and then division is gratifying to scientists, who see it as a "protocellular cycle" (Figure 13), in analogy with the cell cycle, including stages of growth and division. During these cycles, formation of droplets, their growth and division occurs in three different chips. Properties specific to living things in this modelling of life result from interaction of populations of individuals with an environment established one at a time.

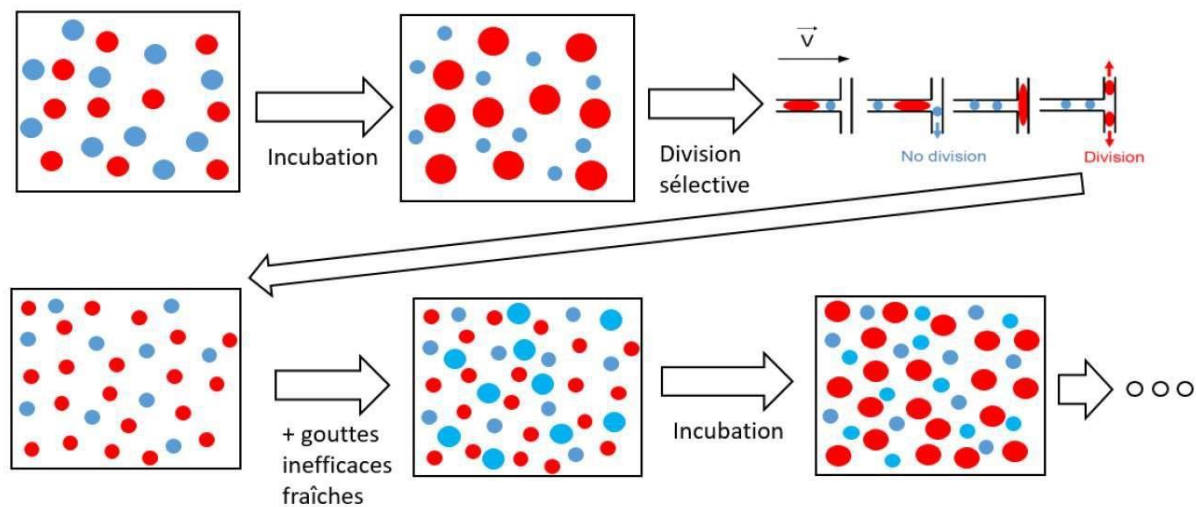


Figure 31 Diagram showing main stages of the established protocellular cycle. Squares represent microfluidic chips. Red circles are efficient droplets and blue circles are inefficient ones. Light blue circles are inefficient droplets added later.

4.1.6. Theories and experiences: circular connections

Biological concepts are extended in light of the experimental results. These successions of steps, the result of arduous repetitions, allow researchers to conclude that a natural selection has emerged, without reference to Darwinian evolution, which would require more properties.¹ By analogy between observed natural life processes and induced artificial processes: different genotypes (chemical compositions) lead to different phenotypes (droplet sizes); and subjected to selection pressure (T-shaped junction), only populations of subjects with a specific trait (large volume) increase. One challenge of this modelling is to find physicochemical equivalents to

¹ Note that the paper presented in Part 4.2 does not conclude to the realization of a natural selection. The present part is based on discussions that came before the redaction phase, which is as well a moment of concepts reshaping.

purely biological notions such as genotype or phenotype. This work is essential to be able to model a gradual transition from the physicochemical world to the biological one. It encourages a continuous redefinition of conceptual categories and their application according to experimental results. For example, the notion of inheritance is redefined repeatedly during the experiment, and is finally replaced by that of heritability,¹ considered more flexible.

This influence of experience on theory is even more evident when an unforeseen empirical phenomenon quickly leads to the emergence of a new notion of "death."² If the inefficient droplets reduce in size for too long, they concentrate calcium which precipitates on the surface to form a hard layer surrounding the entire droplet. The shape of the latter takes on the appearance of a stone, and is said to be "petrified" (Figure 14). Researchers infer that this shell prevents any exchange between the interior and exterior of the droplet. Therefore, even in the presence of molecules favorable to growth in the medium, these droplets remain inert and can no longer grow. The word goes out promptly: "They are dead." The cessation of all exchange and inability to alter form prove sufficient to provide the researcher's conceptual framework with a new notion of death as it applies to protocells, namely the death of an object not completely alive, but also not quite inert. Subjective attribution of a capacity to die, an exclusive property of the living, constitutes crossing an additional level on the scale of aliveness. In this context, an organism must be opened to the outside world to be considered alive. Likewise, over the course of these experiments, the notion of aging has developed in scientific discourse. In fact, a "parasitic reaction" depletes droplets of reagents after a few hours (Cannizzaro reaction) and "fresh" droplets must be added to restart a second cycle. For researchers, protocellular old age may then be understood as the exhaustion of a chemical reaction, inducing a slowdown in growth.

¹ And afterwards by "non-genetic heritability" (see Part 4.2).

² Interestingly, because it does not influence the purpose of the final paper (Part 4.2), this phenomenon and its conceptualization is totally absent from the paper.

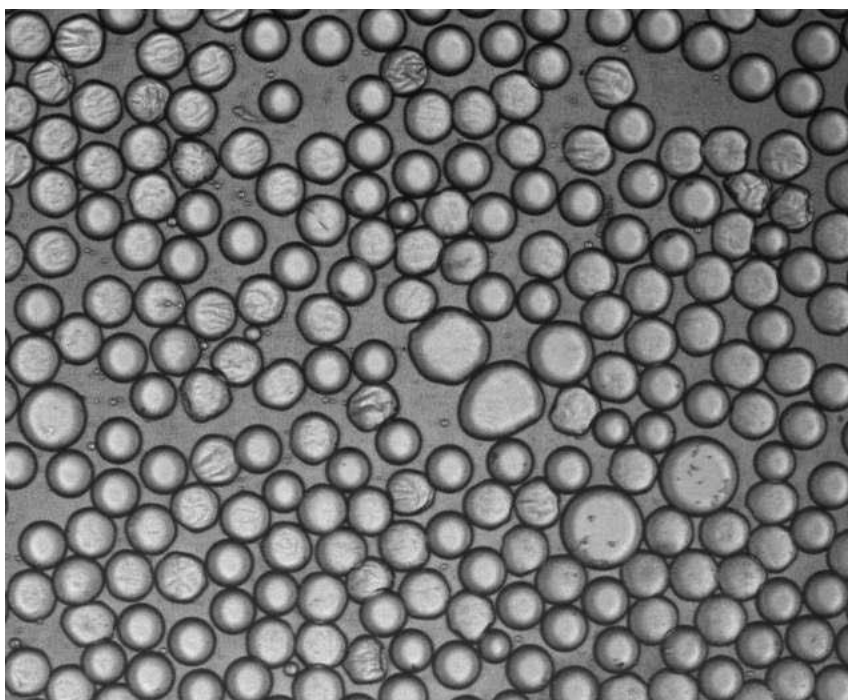


Figure 32 Microscopic image of so-called "dead" droplets. If the incubation is too long during the experiment, a solid deposit forms around the droplets, preventing any exchange with the exterior.

Building on the accumulation of theoretical and empirical results, researchers fix and renew concepts occur during discussions. They debate principal biological concepts that may apply to their system. They review results and analogies to assess their relevance and explanatory power. The implicit goal of these meetings is to raise the degree of aliveness of the artifacts produced as much as possible, while remaining as rigorous as possible. Chemfit project scientists are convinced of the elevated degree of aliveness of the droplets, based on the terms they exchange in conversation. Droplets before divisions are called "parents" or "mothers" and, when divided, "offspring" or "daughters." Reagents of the formose reaction are called "food," or colloquially "chow", "eaten" or "fed on" by droplets. Researchers intuitively consider the degree of aliveness of droplets caught in this dynamic to be so advanced that it even becomes possible to identify with a droplet and think like one. At a meeting, a scientist might suggest: "That means as soon as I have the chow, I consume it immediately," while another replies: "Yes, in essence you will eat your own chow." The use of these pronouns is clear. By tacit agreement, a researcher becomes a droplet and meeting participants join this role playing as if it were self-evident. In this imaginative work shaped by dialogue, droplets are alive and well.

It is also essential to underline that the metaphor of the living/machine, widespread in the world of biological research,³⁰ is definitely not used by researchers on the project. Whereas food is often equated with "fuel" in biologists' vocabulary,³¹ the response in this case is clear. The reagents are food, but no mention of fuel is ever made. They do not think of themselves as machine builders, but rather cooks who regularly discuss "ingredients to make life". Their goal is to add the correct ingredients under the correct conditions to start the process of life, not assemble a living being piece by piece.

Vocabulary alters during the course of experiments, analyses and discussions. The change is especially motivated by oral presentations, laboratory meetings and conferences, where it becomes a question of convincing the scientific community of successfully having raised the degree of aliveness of protolife significantly. Therefore, changes in vocabulary used to name the two main populations of droplets are highly revealing. As a reminder, on the one hand the two populations correspond to droplets that increase and then divide, and on the other hand, to droplets that reduce and do not divide. At the start of my participant observation, the populations were characterized as "efficient" and "inefficient". These words presuppose an apparent finality in action. Droplets are considered efficient if they achieve a goal (here growth and division) and not if they fail to do so. Living beings as well as objects can be called efficient; efficiency is not a quality unique to living things. But after several months of using these words, a researcher breaks new ground in a spoken communication for the lab's weekly seminar. In the presentation, the droplets now become "lucky" or "unlucky". This change is full with presuppositions. In the daily life of the laboratory and elsewhere, the word "lucky" is generally used to refer to a living being who accidentally encounters events favorable to the realization of projects. If the idea of a goal were already present behind the term "efficient," two new considerations of chance and life are consequently introduced with the adjective "lucky." Inserted into a new narrative of restitution, the droplets are fully alive and their destiny occurs by chance. I believe that the intentional introduction of chance into the narrative owes nothing to chance, so to speak. This property is indeed an essential prerequisite for Darwinian evolution in which variations must appear randomly. Introducing the property amounts to significantly increasing the experimental system's degree of aliveness. Other spoken communications thereby include the words "winner" and "loser." The notion of chance disappears but that of competition, also essential to the theory of evolution, becomes apparent. Each word becomes a rhetorical instrument for convincing the community of the project's achievements (Figure 15).¹

¹ Note that the terms used for the two categories of droplets in section 4.2 are "C2 droplet" and "no C2 droplet" (referring to their chemical composition only). The use of the former terms will not have passed the selection of the writing process, which here consists, as a reminder, in a compromise between restitution of an elevation of aliveness, a scientific rigor, and the acceptability from the editors and the reviewers.

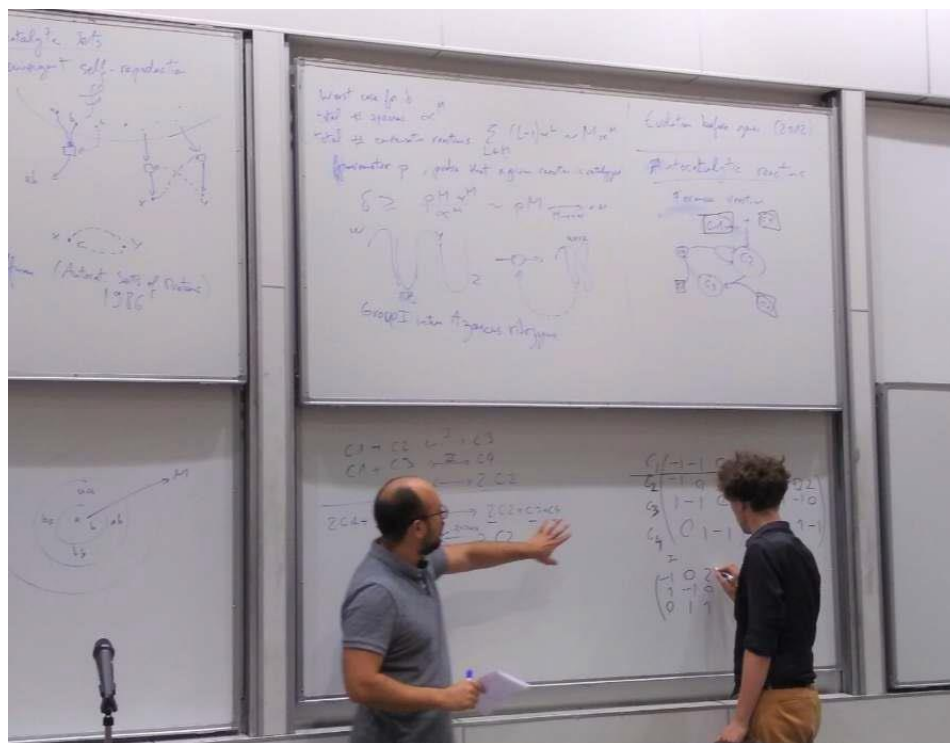


Figure 33 Conference presentation of results. During spoken communications of their results, researchers try to convince colleagues of the relevance of their modelling of living organisms.

4.1.7. Discussion

While no one has yet succeeded in making living beings from the inert, many scientists have made and are still making a multitude of protolives, of which the aforementioned microfluidic droplets are an example. Behind this term, I am referring to objects made, and intended as part of a transition from the inert to the living. They are embodiments of theories of life maintained by scientists who make them. Therefore, they are hybrid objects, materially and epistemically. Because protolives are synthesized with intent to produce one or more perceived properties of living things, they are inseparable from a dynamic aimed at increasing their degree of aliveness, as in the case in the Chemfit project. The involved scientists incorporate properties of living things that they perceive and theorize into new objects. However they conceptualize life forms as mere particular states of the physicochemical world. The notion of degree of aliveness largely reconfigures life into a set of interwoven processes.

The diversity of knowledge about life is partly translatable into a diversity of protolives, resulting from different technical productions. Among them, we find the technique of droplet microfluidics, not usually used in this perspective. It is mainly employed to form thousands of compartments for testing thousands of different chemical reactions. But here, Chemfit researchers use it to model a gradual onset of life. It is a question of modelling the unknown by a new process. Much of the work of researchers consists of developing a set of interacting synthetic artifacts, within which such properties will emerge. The approach of the Chemfit project scientists whom I have studied follows: by setting life properties as objectives (Darwinian evolution), they develop new technical processes (compartmentalized chemical

reactions) to raise the degree of aliveness in the protolives produced (dynamic populations of droplets). First they imitate living beings by forming droplets filled with reactive chemicals, and second they model life by setting evolutionary dynamics at the population level within specific environments. This modelling of the transition from the inert to the living is the result of reciprocal influences between theories of life and experiments. The central place given to Darwinian evolution partly determines the shape of the protolives to be synthesized, and unexpected attributes which they present in turn modify the conceptual landscape relating to living things.

References

- 1 J. D. Watson and F. H. Crick, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1953, **18**, 123–131.
- 2 S. L. Miller, *Science*, 1953, **117**, 528–529.
- 3 J. Loeb, *The Mechanistic Conception of Life*, The University Of Chicago Press, 1912.
- 4 C. E. Cleland, *Synthese*, 2012, **185**, 125–144.
- 5 P. Pitrou, in *Au seuil de la forêt. Hommage à Philippe Descola, l'anthropologue de la nature*, eds. N. Martin, T. Manicone, P. Le Roux and G. Cometti, Editions Tautem, Mirebeau-sur-Bèze, 2019, pp. 859–879.
- 6 B. Latour and S. Woolgar, *Laboratory Life. The construction of scientific facts*, 1979.
- 7 S. A. Benner, *Astrobiology*, 2010, **10**, 1021–1030.
- 8 P. Pitrou, *L'Homme*, 2014, **4**, 159–189.
- 9 L. Coupaye, *Growing Artefacts, Displaying Relationships*, Bergham, New-York, 2013.
- 10 S. Roosth, *Synthetic : How Life Got Made ?*, The University Of Chicago Press, Chicago, 2017.
- 11 P. Pitrou, *NatureCulture*, 2017, **4**, 1–37.
- 12 E. Hallam and T. Ingold, *Making and Growing. Anthropological Studies of Organisms and Artefacts*, Routledge, Abingdon-on-Thames, 2016.
- 13 J. D. Sutherland, *Nat. Rev. Chem.*, 2017, **1**, 1–8.
- 14 C. Malaterre, *Biol. Philos.*, 2010, **25**, 643–658.
- 15 G. Canguilhem, in *La connaissance de la vie*, Vrin, Paris, 2006.
- 16 G. Bachelard, *Le Nouvel Esprit Scientifique*, Presse Universitaire de France, Paris, 1934.
- 17 E. F. Keller, *Making sense of life : explaining biological development with models, metaphors, and machines*, Harvard University Press, 2002.
- 18 M. Burnam-Fink, S. J. Desch, D. Scalice, H. Davis, C. J. Huff and D. Apai, *Astrobiology*, 2018, **18**, 365–375.

- 19 R. Pascal and A. Pross, *Synlett*, 2017, **28**, 30–35.
- 20 S. Mann, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2013, **52**, 155–162.
- 21 Centre Nationale de Ressources Textuelles et Lexicales, <https://www.cnrtl.fr/definition/prototype>, (accessed 7 July 2021).
- 22 C. Jeancolas, *Hist. Philos. Life Sci.*, 2020, **42**, 22.
- 23 G. F. Joyce, in *Origins of Life : The Central Concepts*, eds. D. W. Deamer and G. Fleischaker, Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1994.
- 24 J. M. Smith, *The Theory of Evolution*, Cambridge University Press, Cambridge, 1958.
- 25 L. Gabora, *J. Theor. Biol.*, , DOI:10.1016/j.jtbi.2005.12.007.
- 26 R. Hooke, *Micrographia : or or Some Physiological Descriptions of Minutes Bodies Made by Magnifying Glasses. With Observations and Inquiries Thereupon*, The Royal Society, London, 1665.
- 27 R. Virchow, *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*, Verlag A. Hirschwald, Berlin, 1858.
- 28 A. Lopez and M. Fiore, *Life*, , DOI:10.3390/life9020049.
- 29 S. Helmreich, *Sounding the Limits of Life : Essays in the Anthropology of Biology and Beyond.*, Princeton University Press, 2015.
- 30 D. J. Nicholson, *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.*, 2013, **44**, 669–678.
- 31 J. Boldt, *Life Sci. Soc. Policy*, , DOI:10.1186/s40504-018-0077-y.
- 32 J. Benyus, *Biomimicry : Innovation Inspired by Nature*, Harper Collins, New-York, 1997.
- 33 L. Kamili, École des hautes études en sciences sociales., 2019.
- 34 R. Saladino, J. E. Šponer, J. Šponer, G. Costanzo, S. Pino and E. Di Mauro, *Life*, , DOI:10.3390/life8020024.
- 35 A. Pross, *J. Syst. Chem.*, 2011, **2**, 1–14.

4.2. Emergent fitness and ecological dynamics of compartmentalised autocatalytic chemical reactions

4.2.1. Introductory Paragraph

Sustained growth of autocatalysts in growing and dividing compartments, with autocatalysis tightly coupled to compartment growth and division, is envisioned to be at the heart of emerging metabolism as well as primordial and synthetic protocells. Such behaviour is also a prerequisite for natural selection, affording differential reproduction and survival of individuals due to differences in phenotype, or ‘survival of the fittest’, the central tenet of Darwin’s theory of evolution¹. Understanding emergence of natural selection in non-biological systems is critical to understand the emergence of evolution and the origin of life. However, to date, natural selection has only been reported in living systems, or *in vitro*, based on the replication of nucleic acids by sophisticated enzymes²⁻¹. Here, a reaction-diffusion model, verified experimentally using the autocatalytic formose reaction⁵⁻⁷, shows that, in a mixture of droplets with different initial concentrations of an autocatalytic species (glycolaldehyde), droplets containing efficient autocatalytic reactions can grow, by osmosis⁸, and more than double in volume at the expense of droplets containing less efficient autocatalytic reactions, which decrease in volume, driven by competition for a common resource (formaldehyde). Subsequent shearing results in the selective division of the largest droplets, thereby converting growth differences into fitness differences. Additionally, competition for a common resource leads to ecological dynamics, with growth rates varying as a function of the composition of surrounding droplets. This induced variation is found to be moderately heritable: growth rates before division correlate with growth rates after division in a subsequent round of competition with fresh droplets. This ‘infrabiological’ system⁹, which displays a number of features of living systems, opens the way to a full eco-evolutionary analysis, including quantitative assessment of the degree of phenotypic plasticity¹⁰, heredity¹¹ and selectability of compartmentalised, non-biological replicator systems with significance for abiogenesis, that might undergo limited evolution by natural selection.

catalytic functions¹⁶, to prevent takeover by parasitic replicators¹⁷⁻²⁰, to raise the error threshold²¹, and to evolve reaction networks²², compartments appear to be essential. While transient, non-biological, non-reproducing compartments may be sufficient^{18,20,21}, the establishment of compartment lineages¹⁷, inherent to Darwinian evolution in living systems today, is highly advantageous, and still needs to be explained. There is, thus, an ongoing effort to couple RNA replication to the growth and replication of lipid vesicles that function as

¹.2.2. Main text

In contemporary living systems hereditary replication is achieved by enzyme-catalysed templated-replication of nucleic acids in cells, coupled tightly with cell growth and division. During the origin of life, replicators, such as putative self-replicase ribozymes¹²⁻¹⁵ may have undergone natural selection in the absence of compartments. Nucleic acids have been evolved *in vitro*, selected for replication rate, ligand binding and catalysis, relying on catalysis of template-based replication by highly evolved enzymes²⁻⁴. However, to select for more complex

protocells²³. It seems implausible that such a sophisticated system could arise by chance. However, theoretical studies suggest that a more rudimentary form of evolution may be possible, based, not on template-based replication, but on compartmentalised autocatalytic chemical reaction networks²². Autocatalytic synthesis of an imine surfactant has been shown to favour droplet fragmentation²⁴. So far, however, there has been no experimental demonstration of coupling of an autocatalytic chemistry to compartment growth and division, as envisioned decades ago²⁵.

Here, we demonstrate that chemistry can be coupled to compartment growth and division in a simple physicochemical system in which autocatalytic reactions, compartmentalised in aqueous droplets in an emulsion are coupled by osmosis and diffusion and compete for a common reactant, leading to emergent fitness at the compartment level.

4.2.2.i. Coupling autocatalysis and droplet growth

Osmotic mismatches between aqueous droplets in emulsions drive changes in droplet volume⁸. We hypothesised that if an autocatalytic reaction ([Fig. 1a, top](#)) is compartmentalised in droplets, reactants and solvents exchange quickly, and products exchange slowly between droplets, accumulation of products in droplets with more efficient reactions might drive growth of these droplets at the expense of droplets with less efficient reactions ([Fig. 1a, bottom](#)). The autocatalytic reaction is a toy model of the formose reaction⁵⁻⁷, a reaction catalysed by a base and a divalent metal ion such as Ca^{2+} , in which formaldehyde (C1), reacts with glycolaldehyde (C2), to generate, after a hydride shift, dihydroxyacetone (C3), which again reacts with C1, forming, after a hydride shift, aldotetrose (C4), which can split into two molecules of C2, rendering the system autocatalytic ([Fig. 1b](#)). The formose reaction system is, in truth, more complex, comprising several autocatalytic cycles, making sugars up to at least C7, Cannizzaro, oligomerisation, hydration, cyclization and acid-base reactions ([Extended Data Fig. 1](#)).

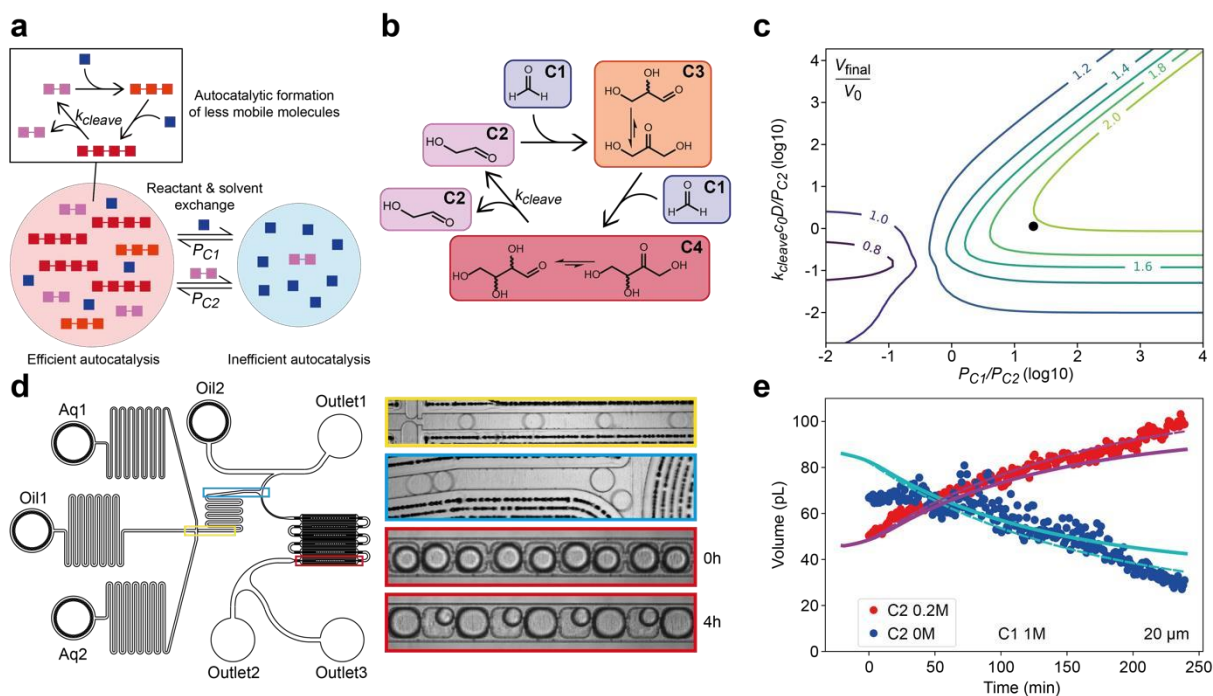


Fig. 1. Droplet growth driven by autocatalytic reactions. **a**, Schematic of a prototypical autocatalytic reaction compartmentalised in aqueous droplets in an emulsion. It is a toy model of the formose reaction, in which formaldehyde (C1, blue square), reacts with glycolaldehyde (C2, two purple squares), to form dihydroxyacetone (C3, three orange squares), and the tetramer to aldotetrose (C4, four red squares). Solvent (water) and reactants C1 and C2 exchange between droplets (with permeabilities P_{H_2O} , P_{C1} and P_{C2} , respectively). **b**, The reactions comprising the toy model of the formose reaction. k_{cleave} , is the rate constant for the reaction $C_4 \rightarrow 2C_2$, the ratelimiting step of autocatalysis. **c**, Phase diagram, constructed using the toy model, for volume change among a pair of droplets containing standard formose reagents with 0.2 M C2 and with no C2, 20 μm inter-droplet distance, L , and $P_{H_2O}L$ of 4000 $\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{m}^{-1}$. The contours indicate the ratio of final to initial droplet volume, V_{final}/V_0 , for the droplet containing 0.2 M C2. Note that growth exceeds the effect of initial osmotic contrast only for $V_{final}/V_0 > 1.2$. The black dot indicates the experimental values of $k_{cleave}c_0D/P_{C2}$ and P_{C1}/P_{C2} in subsequent experiments. **d**, The microfluidic device used to produce one-dimensional (1D) arrays of aqueous droplets with alternating size and composition (left panel). Inlets for oil phase (Oil1 and Oil2), the aqueous phase inlets for the two droplet compositions (Aq1 and Aq2), and the outlets (Outlet1, Outlet2 and Outlet3) are indicated. The zones for droplet formation (yellow rectangle), the hydrodynamic switch for on-demand droplet loading (blue rectangle), and one of the six 1D droplet arrays (red rectangle) are indicated. Bright field images of drop formation, the hydrodynamic switch, and alternating ~ 40 pL and ~ 80 pL droplets containing the standard formose reagents, with 0.2 M glycolaldehyde (0.2 M C2) or no C2 (no C2), respectively, after 0 h and 4 h incubation at 40°C are also shown (right panels). See also [Supplementary Movies 1-4](#). **e**, Plot of the volume of a single droplet containing an efficient formose reaction (0.2M C2, red dots) and the mean volume of its two nearest neighbours containing an inefficient formose reaction (no C2, blue dots), versus time, with 20 μm centre-to-centre separation, L , at 40°C. The best fit curves from the toy model are shown using $k_{H_2O}L = 4000$ $\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ and previously determined $P_{C1} = P_{H_2O}$, $P_{C2}/P_{H_2O} = 0.05$, and $P_{Cn} = 0$ for $n \geq 3$ ([Extended Data Fig. 4](#)), k_{add} and k_{cleave} values (solid purple and cyan lines) and with k_{add} increased 4-fold (dashed purple and cyan lines) ([Extended Data Fig. 2a](#)). For data for all droplets, with different droplet separations and compositions, see [Supplementary Figure 2](#).

We devised a ‘toy model’ of formose autocatalysis with C1 to C4 species ([Online Methods](#) and [Supplementary Information](#)). It has two parameters, k_{add} , the rate constant for the reactions $C_1 + C_2 \rightarrow C_3$ and $C_1 + C_3 \rightarrow C_4$ (taken to be irreversible) and for the reverse of reaction $C_4 \rightleftharpoons 2C_2$, and k_{cleave} , the rate constant for the forward reaction $C_4 \rightleftharpoons 2C_2$, which is the rate-limiting

step. Fitting the toy model to kinetics of C1 consumption (Extended Data Fig. 2a) using a mixture of 1 M formaldehyde (C1), 0.02 M CaCl₂ and 1 M of the superbase 1,1,3,3-tetramethylguanidine (TMG) (hereafter referred to as “standard formose reagents”) and 0.2 M of glycolaldehyde (C2) (Online Methods), yielded k_{add} and k_{cleave} values of 2.8 M⁻¹.min⁻¹ and 0.06 min⁻¹, respectively, close to those previously reported²⁶. The rate of the Cannizzaro reaction, measured by nuclear magnetic resonance (NMR) (Extended Data Fig. 3), was also consistent with previous reports²⁶. However, addition of the Cannizzaro reaction to the toy model has a negligible effect on autocatalytic kinetics (Extended Data Fig. 2b).

We first examined numerically the conditions for autocatalysis and droplet growth by combining the toy model with a model for solvent and solute exchange between droplets (Online Methods and Supplementary Information) with permeability P_X for compound X .

Assuming P_{C3} and $P_{C4}=0$, fixing P_{H2O} , and varying P_{C1} , P_{C2} , and k_{cleave} , confirmed that droplets containing an efficient autocatalytic reaction (initially containing 1 M C1 and 0.2 M C2) can grow at the expense of droplets containing a less efficient autocatalytic reaction (initially containing 1 M C1). However, significant growth is possible only when both the dimensionless numbers $k_{cleave}c_0D/P_{C2}$ (comparing reaction rate and C2 exchange rate, where c_0 is water concentration and D is typical droplet diameter, see Online Methods) and P_{C1}/P_{C2} (comparing the rate of exchange of C1 and C2) are high i.e. if both autocatalysis and reactant (C1) exchange outpace autocatalyst (C2) exchange (Fig. 1c). However, at fixed P_{C1}/P_{C2} , if the reaction rate is too large even a small amount of exchanged C2 triggers the rapid conversion of C1 into formose products, thus C2 accumulation does not provide any kinetic advantage.

We determined, independently of the formose reaction, P_{H2O} , and P_{C1-C12} using a microfluidic system to produce one-dimensional (1D) arrays of aqueous droplets with alternating composition²⁷ dispersed in fluorinated oil containing fluorosurfactant²⁸ (Fig. 1d, Extended Data Fig. 4, Supplementary Fig. 1). The model of solute and solvent exchange was used to analyse the osmotically driven volume changes of alternating ~80 pL and ~120 pL droplets containing high and low solute concentrations, respectively. P_{H2O} and P_{C2} are inversely proportional to the distance between droplets, L , and $P_{H2O}L$ and $P_{C2}L$ are independent of L : $P_{H2O}L$ is 532±148 mol.min⁻¹.µm⁻¹ (SD, N=43), $P_{C2}L$ is 32±5 mol.min⁻¹.µm⁻¹ (SD, N=43), P_{C2}/P_{H2O} is 0.063±0.013

(SD, N=43). $P_{C1}/P_{H2O} \geq 1$, and $P_{C3-12}/P_{H2O} \leq 0.01$ (and probably ≤ 0.0006). Assuming $k_{cleave}=0.06$ min⁻¹ (Extended Data Fig. 2), a typical exchange time of C2 of $P_{C2}/c_0D = 19$ min (with 20 µm droplet separation), $k_{cleave}c_0D/P_{C2} = 1.13$ and $P_{C1}/P_{C2} = 20$, which lies in the regime where autocatalysis drives droplet growth (black dot in Fig. 1c).

The same 1D droplet array system was then used to test experimentally whether the formose reaction could drive droplet growth. All droplets contained standard formose reagents, with ~40

pL droplets additionally containing 0.2 M C2 (0.2 M C2 droplets), alternated with ~80 pL droplets containing no C2 (no C2 droplets) (Fig. 1d; Supplementary Movie 1). At 40°C, 0.2 M C2 droplets doubled in volume in ~240 min, while no C2 droplets decreased by a similar volume, matching closely the predictions of the toy model using $k_{H_2O}L = 4000 \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ (the only fitting parameter) and previously determined $P_{C1} = P_{H_2O}$, $P_{C2}/P_{H_2O} = 0.05$, and $P_{Cn} = 0$ for $n \geq 3$, k_{add} and k_{cleave} values (Fig. 1e).

Neither the small difference in initial osmotic potential ($\leq 10\%$), nor Ostwald ripening²⁹, which drives larger droplets to grow at the expense of smaller ones (the opposite is observed here), can account for the observed volume changes. The rate of volume change was reduced in the absence of CaCl₂, and zero in the absence of CaCl₂ and TMG, consistent with volume changes being driven by the formose reaction (Extended Data Fig. 5).

4.2.2.ii. Competitive dynamics

We then investigated droplet growth in two-dimensional (2D) arrays of monodisperse droplets⁸. As in the 1D experiments, when incubated at 40°C, 0.2 M C2 droplets (unlabelled) grew at the expense of no C2 droplets (green fluorescent), which shrank. However, growth rate of 0.2 M C2 droplets was a function of the intensity of competition for C1: growth rate depended on both local and longer-range effects, increasing as the number of neighbouring no C2 droplets and the fraction of no C2 droplets increased (Fig. 2a, b, Supplementary Movie 2).

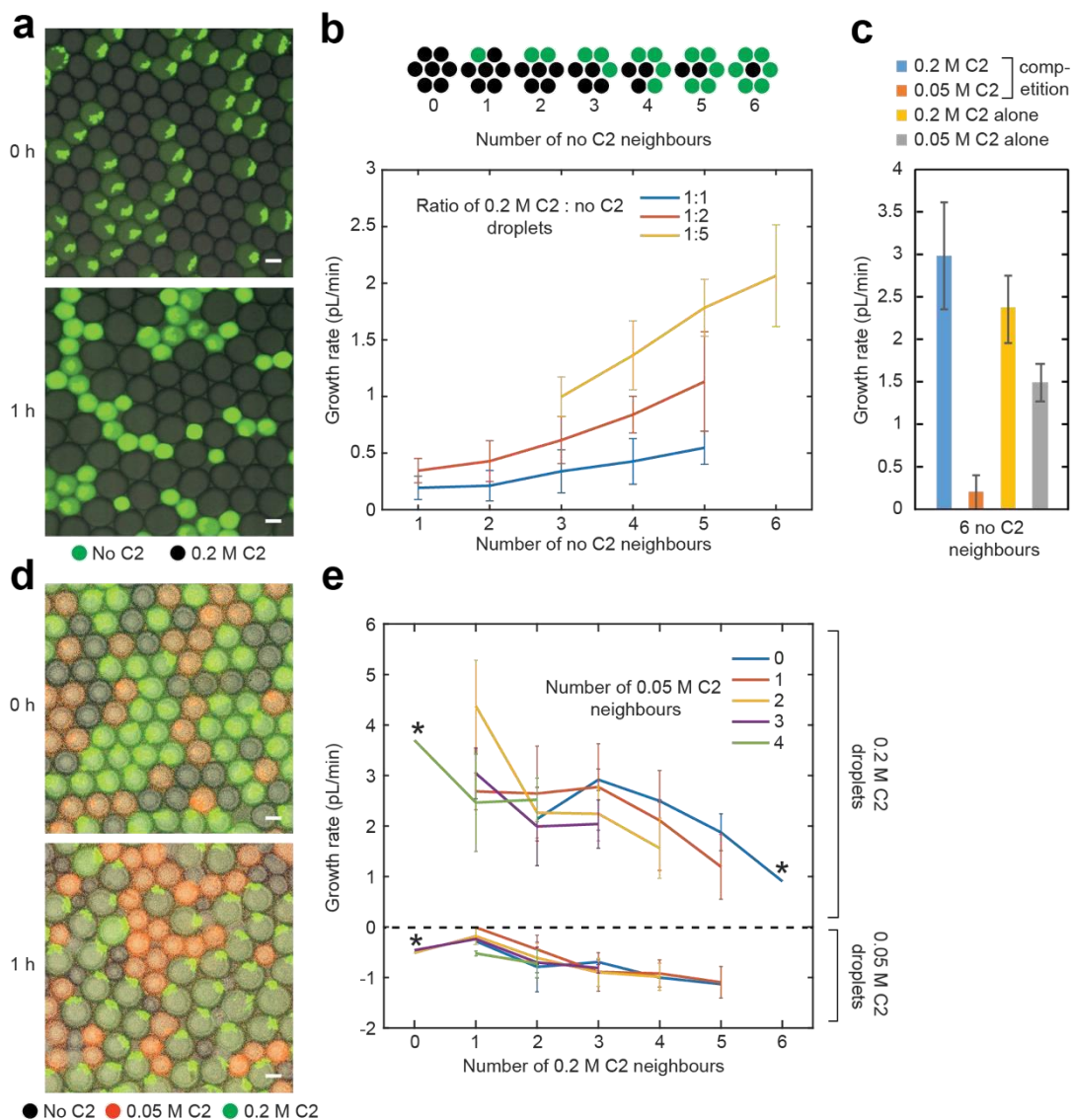


Fig. 2. Competition between droplets for a common reagent. **a**, Fluorescence images of a two-dimensional (2D) array of a 1:1 mixture of 778 pL aqueous droplets containing standard formose reaction reagents with 0.2 M glycolaldehyde (0.2 M C2, unlabelled) or no C2 (no C2, labelled with green fluorescent silica nanoparticles), before (0 h) and after a 1 h incubation at 40°C (1 h). Scale bars represent 100 μm . See also [Supplementary Movie 5](#). **b**, As a) but with 1:1, 1:2 and 1:5 ratios of droplets containing no C2 or 0.2 M C2 (84, 60 and 83 pL volume, respectively). Growth rates of 0.2 M C2 droplets are plotted as a function of the initial number of the number of no C2 neighbour droplets (1 to 6), and the ratio of 0.2 M C2 : no C2 droplets. **c**, Three experiments were performed as a), with 81 pL volume no C2 droplets (unlabelled), 0.2 M C2 droplets (labelled with green silica particles) and 0.05 M C2 droplets (labelled with red silica particles) mixed in a 4:1:1 ratio (competition); with 72 pL volume no C2 and 0.2 M C2 droplets mixed in a 2:1 ratio (0.2 M C2 alone); and with 68 pL volume no C2 and 0.05 M C2 droplets mixed in a 2:1 ratio (0.05 M C2 alone). Mean growth rate is indicated for 0.2 M C2 and 0.05 M C2 droplets with six no C2 neighbours. **d** and **e**, As a), but with a 1:1:1 ratio of 157 μL droplets containing no C2, 0.2 M C2 or 0.05 M C2. **d**, Fluorescence images of 2D droplet arrays before (0 h) after a 1 h incubation at 40°C (1 h) (top). Scale bars represent 50 μm . See also [Supplementary Movie 6](#). **e**, Growth rates are plotted for all combinations of 6 neighbouring droplets for 0.2 M C2 droplets (top) and 0.05 M C2 droplets (bottom). All error bars correspond to ± 1 standard deviation and the asterisks indicate single data points.

When no C2 droplets were mixed in a 2:1 ratio with either 0.2 M C2 droplets or 0.05 M C2 droplets (containing standard formose reagents plus 0.05 M C2), 0.2 M C2 droplets grew only 1.6-fold more rapidly than 0.05 M C2 droplets in the same local environment (6 no C2 droplet

neighbours) (Fig. 2c). However, in a 4:1:1 mixture of no C2 droplets (unlabelled), 0.2 M C2 droplets (green fluorescent), and 0.05 M C2 droplets (red fluorescent), the growth rate of 0.2 M C2 droplets was 16-fold higher than 0.05 M C2 droplets in the same local environment (6 no C2 droplet neighbours) (Fig. 2c). Hence, droplets compete for C1, and 0.2 M C2 droplets grow at the expense of 0.05 M C2 droplets with a less efficient autocatalytic reaction.

When no C2, 0.2 M C2 and 0.05 M C2 droplets were mixed in a 1:1:1 rather than 4:1:1 ratio, 0.2 M C2 droplets still increased in volume, but 0.05 M C2 droplets did not grow and even decreased in volume (Fig. 2d,e) showing that more stringent competition further inhibits growth of less efficient droplets. Local competition was also observed, with a decrease in 0.2 M C2 droplets growth and an increase in 0.05 M C2 droplets shrinkage as a function of the number of 0.2 M C2 neighbours.

4.2.2.iii. Compartment-level fitness

We next investigated whether differences in growth rate could be converted into differences in fitness by hydrodynamic shearing (see also [Supplementary Information](#)). No C2 droplets (labelled with carbon black) and 0.2 M C2 droplets (unlabelled), were mixed in a 1:1 ratio and incubated 5 h at 40°C in a 2D droplet array. The droplets were then passed through a single, or two successive T-junctions³⁰, which symmetrically divided droplets over a threshold volume (Fig. 3a, top; [Supplementary Movies 7 and 8](#)). This increased the fraction of 0.2 M C2 droplets by 2.2-fold and 3.7-fold, with one and two divisions, respectively (Fig. 3a, bottom), in agreement with the expected fitnesses.

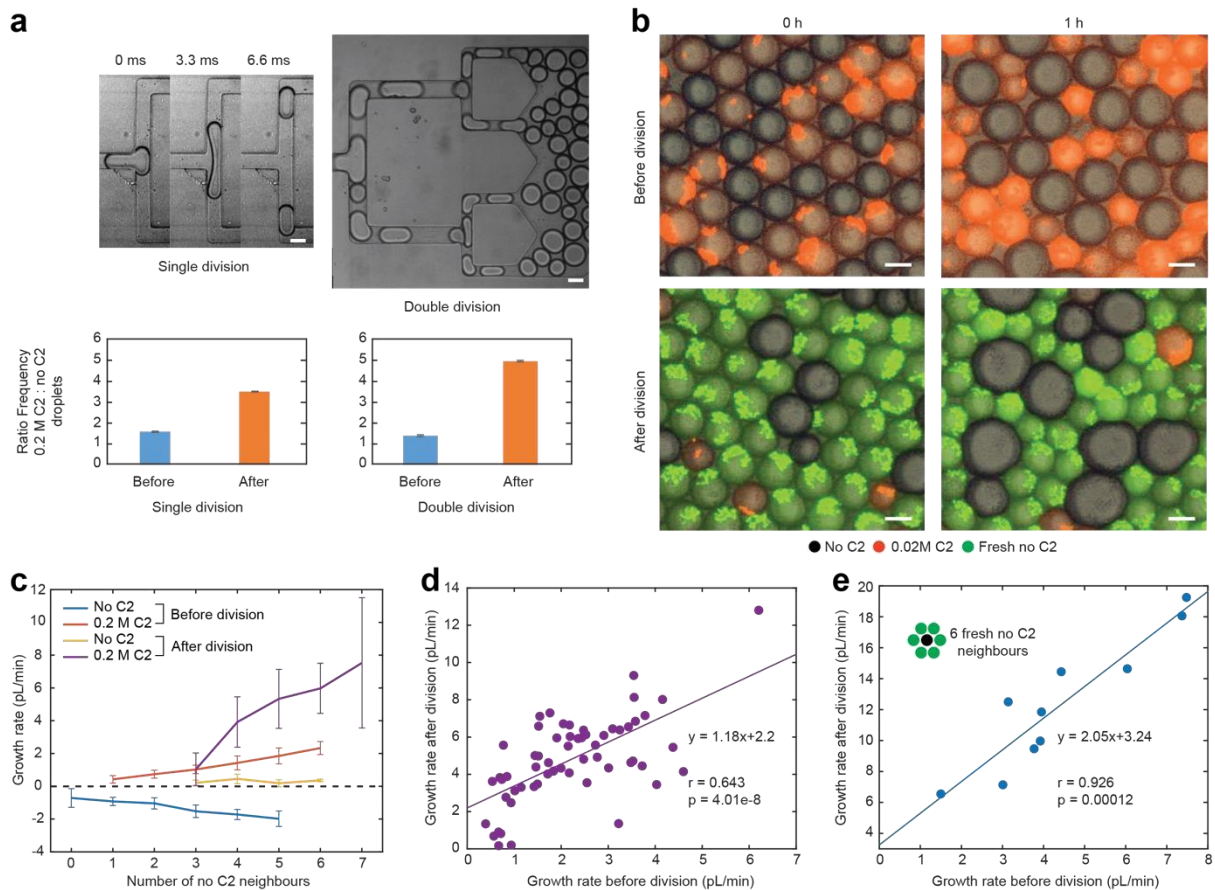


Fig. 3. Translating differences in droplet growth rate into differences in fitness. **a**, Bright field images of single division (top left panel) and double division (top right panel) of droplets in a microfluidic device. Scale bars represent 50 μm . A 1:1 mixture of 238 pL aqueous droplets containing the standard formose reagents and, additionally, either 0.2 M glycolaldehyde (0.2 M C2, unlabelled) or no C2 (no C2, labelled with 0.05% w/v carbon black) were incubated in a 2D droplet array for 5 h at 40°C. The droplets were then passed through the microfluidic devices. Droplets over a threshold volume, v_d , were divided symmetrically at each T-junction ($v_d \square 400$ pL for single division; $\square 400$ pL and $\square 200$ pL for double division). The ratio of the frequency of 0.2 M C2 : no C2 droplets before and after division was determined by image analysis of movies for both single division ($n = 844$ and 1196 droplets, respectively, before and after division, bottom left panel) and double division ($n = 365$ and 330 droplets, respectively, before and after division, bottom right panel). Error bars correspond to the 95% confidence interval. See also [Supplementary Movies 7 and 8](#). **b**, A 2:1 mixture of 71 pL droplets containing standard formose reaction reagents with no C2 (labelled with red silica nanoparticles) or 0.2 M C2 (unlabelled) were mixed in a 2:1 ratio and incubated at 40°C in a 2D droplet array. Fluorescence images of were taken before (0 h, top left) and after a 1 h incubation at 40°C (1 h, top right). See also [Supplementary Movie 9](#). The droplets were then divided symmetrically if the droplet volume exceeded ~ 150 pL (v_d) using a single division microfluidic device. Before division, 36.5% of 0.2 M C2 droplets had volumes $\geq v_d$, whereas after division 8.5% of 0.2 M C2 droplets had volumes $\geq v_d$ and their mean volume was 1.4-fold lower, consistent with division of the majority of droplets over v_d , while their frequency increased 2.0-fold, slightly more than expected, likely due to preferential loss of the smaller no C2 droplets during manipulation. After division, droplets were mixed with a 2-fold excess of freshly prepared 82 pL no C2 droplets (labelled with green silica nanoparticles) and fluorescence images of 2D droplet arrays were taken before (0 h, bottom left) and after a 1 h incubation at 40°C (1 h, bottom right). Scale bars represent 50 μm . See also [Supplementary Movie 10](#). **c**, Growth rates for 0.2 M C2 droplets and no C2 droplets for the experiment in **b** are shown, before and after division, plotted as a function of the number of fresh no C2 neighbour droplets. Growth rates after division were measured directly and growth rates before division were inferred from the initial droplet volume after division (see [Methods](#) and [Extended Data Table 1](#)). Error bars correspond to $\square 1$ standard deviation. **d**, For the same experiment as in **b** and **c**, the growth rate of 0.2 M C2 droplets after division is

plotted against growth rate before division. **e**, As in b-d, but starting with a 1:1 ratio of 169 pL droplets containing no C2 or 0.2 M C2 and adding a 10-fold excess of freshly prepared 140 pL no C2 droplets after selective division with $v_d \approx 240$ pL. The growth rate of 0.2 M C2 droplets with 6 fresh no C2 neighbours after division is plotted against growth rate before division. For both d and e, the growth rate before division is inferred from the initial droplet volume and the line is the best fit by linear regression (see [Online Methods](#)).

To test whether divided droplets can re-grow after division, no C2 droplets (red fluorescent) and 0.2 M C2 droplets (unlabelled) were mixed in a 2:1 ratio, incubated for 1h at 40°C in a 2D droplet array, and passed through a single T-junction to selectively divide droplets that had doubled in volume. Fresh reagents were then provided by adding a 2-fold excess of fresh no C2 droplets (green fluorescent) and the droplets re-incubated for 1h at 40°C in a 2D droplet array. Before division, the 0.2 M C2 droplets increased in volume, while the no C2 droplets decreased in volume, with a rate depending on the neighbouring droplets as already observed ([Fig. 3b](#), [top](#); [Fig. 3c](#); [Supplementary Movie 9](#)). After division, the mean growth rate of 0.2 M C2 droplets was on average, 3.83-fold higher than before division, whereas droplets with no C2 before division grew very slowly ([Fig. 3b](#), [bottom](#); [Fig. 3c](#), [Supplementary Movie 10](#), see [Supplementary Information](#) for a discussion of the difference in growth rates before and after division).

4.2.2.iv. Non-genetic heritability

The same experiment revealed a low but significant correlation ($r = 0.643$, $p = 4.10^{-8}$) between growth rate of 0.2 M C2 droplets before and after division ([Fig. 3d](#)), indicating that differences in growth rates can be transmitted from parent to offspring droplets. As the correlation may be dampened by different levels of local competition for C1 after division, we performed a similar experiment adding a 10-fold excess of freshly prepared no C2 droplets after division. This time, growth rate of the 0.2 M C2 droplets surrounded by 6 fresh no C2 neighbours (i.e., in the same local environment) after division strongly correlated with inferred growth rate before division ($r = 0.926$, $p = 1.2 \cdot 10^{-4}$) ([Fig. 3e](#)). Growth rate of droplets of identical composition increases with volume ([Extended Data Fig. 6](#)) and, since growth rate variations before division result in volume differences after division, droplet size can provide a mechanism for sustaining growth rate differences. However, as growth rate does not increase linearly with volume ([Extended Data Fig. 6](#)), it cannot fully explain the linear correlation in [Fig. 3e](#), indicating that chemical composition may also play a role. Overall, the system appears to display a rudimentary form of non-genetic heritability, where a ‘heritable’ variation of growth rate is induced by different combinations of neighbouring droplets prior to division.

4.2.2.v. Limit cycles

In a closed system, the formose reaction eventually becomes tar-like ([Extended Data Fig. 7a](#)), which is claimed to be incompatible with autocatalysis and abiogenesis³¹. However, a tar-free steady state was found in a continuously stirred tank reactor³², and a limit cycle was observed in serial transfer experiments ([Extended Data Fig. 7b-d](#)), which can limit the combinatorial explosion of products³³. Likewise, numerical analysis of multiple cycles of droplet growth and size-dependent division using the toy model shows convergence to a limit cycle ([Extended Data Fig. 7e-g](#)), demonstrating that autocatalytic chemistry can drive diffusion of solvent and reactants from neighbours to dilute and replenish droplets, allowing continued cycles of droplet growth and division. Non-autocatalytic chemistries are, however, eventually lost by dilution (*cf.*³⁴).

4.2.2.vi. Conclusion

Our results demonstrate experimentally that protocell growth and reproduction through autocatalytic metabolism, leading to emergent fitness at the compartment level^{25,35,36} is feasible (see [Supplementary Information](#) for a conceptual analysis). However, in our system, there is no need for metabolism to synthesise constituents of an encapsulating membrane^{25,35,36}, as growth is driven by osmosis. Furthermore, it enables other emergent evolutionary properties: we observe a form of transient “non-genetic inheritance” due to material overlap between parent and offspring, and competitive dynamics among the droplets, enforced by the population structure, leads to diversification. Additionally, competition engenders both positive feedback (efficient reactions get faster and faster) and negative feedback (the efficient reactions deprive less efficient reactions of C1, making them run more slowly), which can lead to multistability and hysteresis/memory³⁷. This, the existence of multiple autocatalytic cycles and co-occurring reactions (as in the formose reaction system³⁸, [Extended Data Fig. 1](#)), and the possibility for autocatalysis to emerge from simple reactions in compartments coupled through exchange³⁸, may provide the means to implement sustained selectable hereditary variation²². These factors may ultimately allow such a system to undergo rudimentary evolution by natural selection.

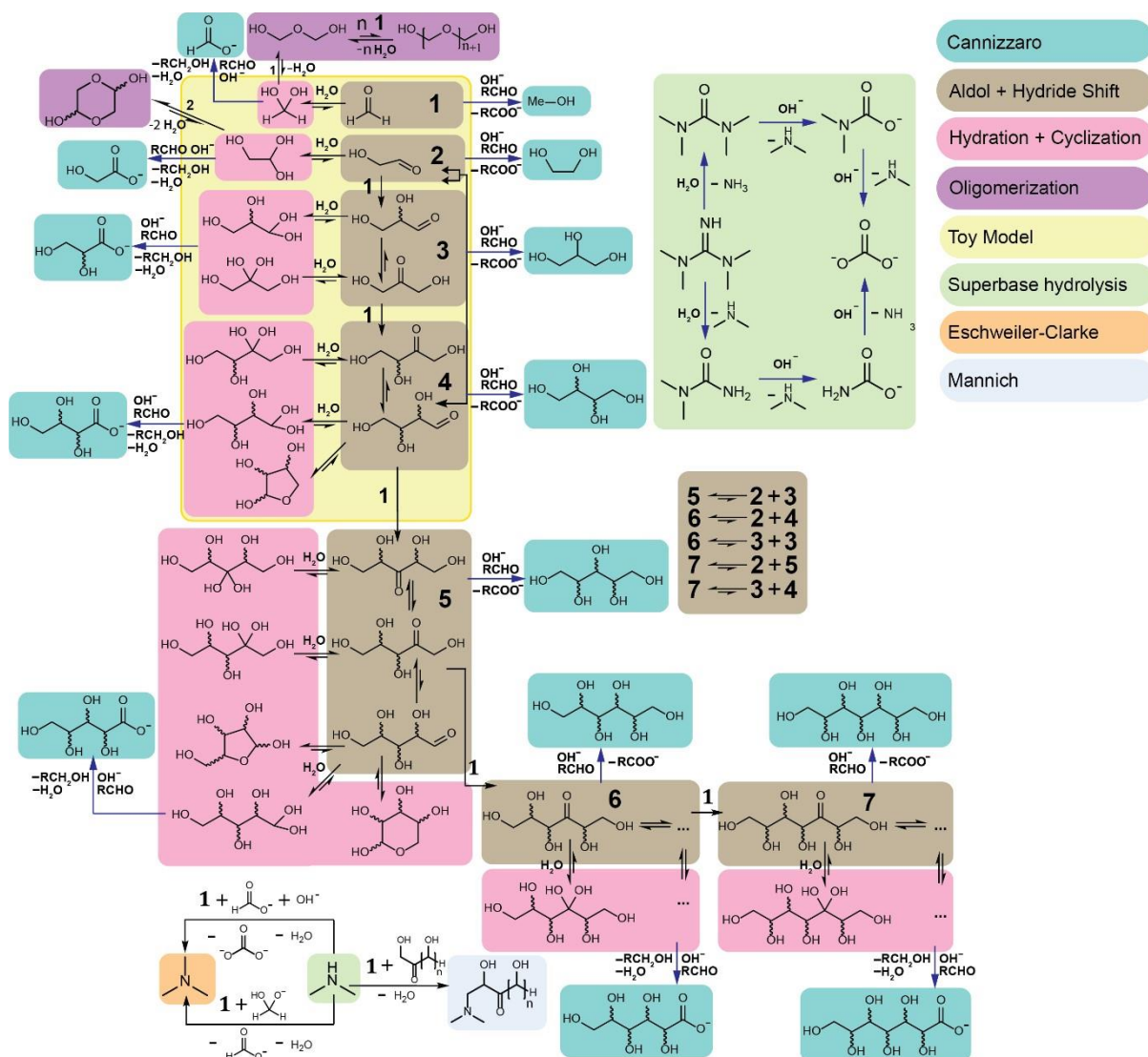
References

- 1 Darwin, C. On the origin of species by means of natural selection, or preservation of favoured races in the struggle for life. (John Murray, London, 1859).

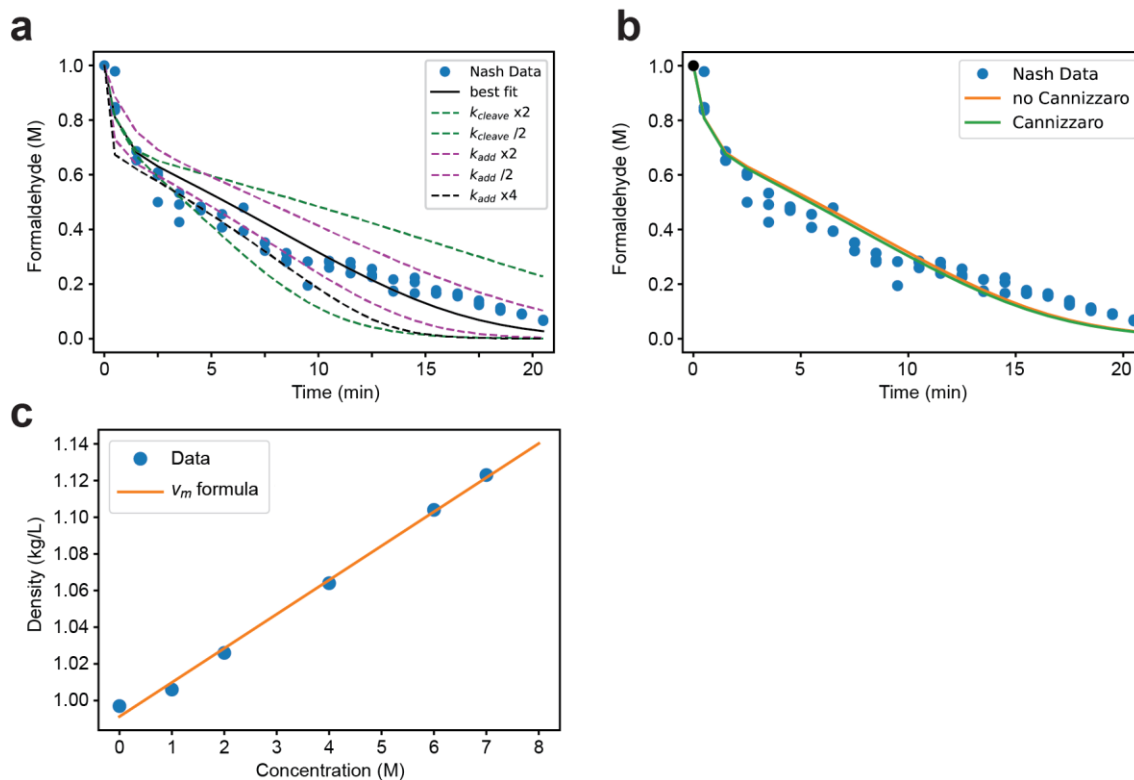
- 2 Mills, D. R., Peterson, R. L. & Spiegelman, S. An extracellular Darwinian experiment with a selfduplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 217-224 (1967).
- 3 Wilson, D. S. & Szostak, J. W. In vitro selection of functional nucleic acids. *Ann. Rev. Biochem.* **68**, 611-647 (1999).
- 4 Jijakli, K. *et al.* The in vitro selection world. *Methods* **106**, 3-13 (2016).
- 5 Butlerow, A. Formation synthétique d'une substance sucrée. *C. R. Acad. Sciences* **53**, 145–147 (1861).
- 6 Breslow, R. On the mechanism of the formose reaction. *Tetrahedron Lett.* **21**, 22-26 (1959).
- 7 Appayee, C. & Breslow, R. Deuterium studies reveal a new mechanism for the formose reaction involving hydride shifts. *Journal Of The American Chemical Society* **136**, 3720-3723 (2014).
- 8 Boitard, L. *et al.* Monitoring single-cell bioenergetics via the coarsening of emulsion droplets. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* **109**, 7181-7186 (2012).
- 9 Szathmáry, E. In search of the simplest cell. *Nature* **433**, 469-470 (2005).
- 10 Sommer, R. J. Phenotypic Plasticity: From Theory and Genetics to Current and Future Challenges. *Genetics* **215**, 1-13 (2020).
- 11 Maynard Smith, J. & Szathmáry, E. The major transitions in evolution (Oxford University Press, Oxford, 1995).
- 12 Attwater, J., Raguram, A., Morgunov, A. S., Gianni, E. & Holliger, P. Ribozyme-catalysed RNA synthesis using triplet building blocks. *eLife* **7**, 2804 (2018).
- 13 Horning, D. P. & Joyce, G. F. Amplification of RNA by an RNA polymerase ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 9786-9791 (2016).
- 14 Johnston, W. K., Unrau, P. J., Lawrence, M. S., Glasner, M. E. & Bartel, D. P. RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* **292**, 13191325 (2001).
- 15 Wochner, A., Attwater, J., Coulson, A. & Holliger, P. Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme. *Science* **332**, 209-212 (2011).
- 16 Agresti, J. J., Kelly, B. T., Jäschke, A. & Griffiths, A. D. Selection of ribozymes that catalyse multiple-turnover Diels-Alder cycloadditions by using in vitro compartmentalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16170-16175 (2005).
- 17 Szathmáry, E. & Demeter, L. Group selection of early replicators and the origin of life. *J. Theor. Biol.* **128**, 463-486 (1987).
- 18 Matsumura, S. *et al.* Transient compartmentalization of RNA replicators prevents extinction due to parasites. *Science* **354**, 1293-1296 (2016).
- 19 Bansho, Y., Furubayashi, T., Ichihashi, N. & Yomo, T. Host-parasite oscillation dynamics and evolution in a compartmentalized RNA replication system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 40454050 (2016).
- 20 Blokhuis, A., Lacoste, D., Nghe, P. & Peliti, L. Selection Dynamics in Transient Compartmentalization. *Phys. Rev. Lett.* **120**, 158101 (2018).
- 21 Blokhuis, A., Nghe, P., Peliti, L. & Lacoste, D. The generality of transient compartmentalization and its associated error thresholds. *J. Theor. Biol.* **487**, 110110 (2020).
- 22 Vasas, V., Fernando, C., Santos, M., Kauffman, S. & Szathmáry, E. Evolution before genes. *Biol. Direct* **7**, 1 (2012).
- 23 Joyce, G. F. & Szostak, J. W. Protocells and RNA Self-Replication. *CSH Perspect. Biol.* **10**, a034801-034822 (2018).

- 24 Taylor, J. W., Eghtesadi, S. A., Points, L. J., Liu, T. & Cronin, L. Autonomous model protocell division driven by molecular replication. *Nat. Comm.* **8**, 237 (2017).
- 25 Gánti, T. Organization of chemical reactions into dividing and metabolizing units: The chemotons. *Biosystems* **7**, 15-21 (1975).
- 26 Socha, R. F., Weiss, A. H. & Sakharov, M. M. Homogeneously catalyzed condensation of formaldehyde to carbohydrates: VII. An overall formose reaction model. *J. Catalysis* **67**, 207-217 (1981).
- 27 Gruner, P. *et al.* Controlling molecular transport in minimal emulsions. *Nat. Comm.* **7**, 10392 (2016).
- 28 Holtze, C. *et al.* Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab Chip* **8**, 16321639 (2008).
- 29 Leal-Calderon, F., Schitt, V. & Bibette, J. *Emulsion Science. Basic Principles*. 2nd edn, (Springer Verlag, New York, 2007).
- 30 Link, D. R., Anna, S. L., Weitz, D. A. & Stone, H. A. Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices. *Phys. Rev. Lett.* **92**, 054503 (2004).
- 31 Benner, S. A. Paradoxes in the Origin of Life. Origins of life and evolution of the biosphere. *J. Int. Soc. Stud. Orig. Life* **44**, 339-343 (2015).
- 32 Weiss, A. H., Seleznev, V. A. & Partridge, R. in *Catalysis in Organic Synthesis* (ed G.V. Smith) 153-164 (Academic Press, New York, 1977).
- 33 Colón-Santos, S., Cooper, G. J. T. & Cronin, L. Taming the Combinatorial Explosion of the Formose Reaction via Recursion within Mineral Environments. *Chemsystemschem* **1** (2019).
- 34 Adamala, K. & Szostak, J. W. Competition between model protocells driven by an encapsulated catalyst. *Nat. Chem.* **5**, 495-501 (2013).
- 35 Gánti, T. *The principles of life*. (Oxford University Press, Oxford, 2003).
- 36 Gánti, T. *The principles of life* (in Hungarian). (Gondolat, Hungary, 1971).
- 37 Angeli, D., Ferrell, J. E. & Sontag, E. D. Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 1822-1827 (2004).
- 38 Blokhuis, A., Lacoste, D. & Nghe, P. Universal motifs and the diversity of autocatalytic systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **117**, 25230-25236 (2020).

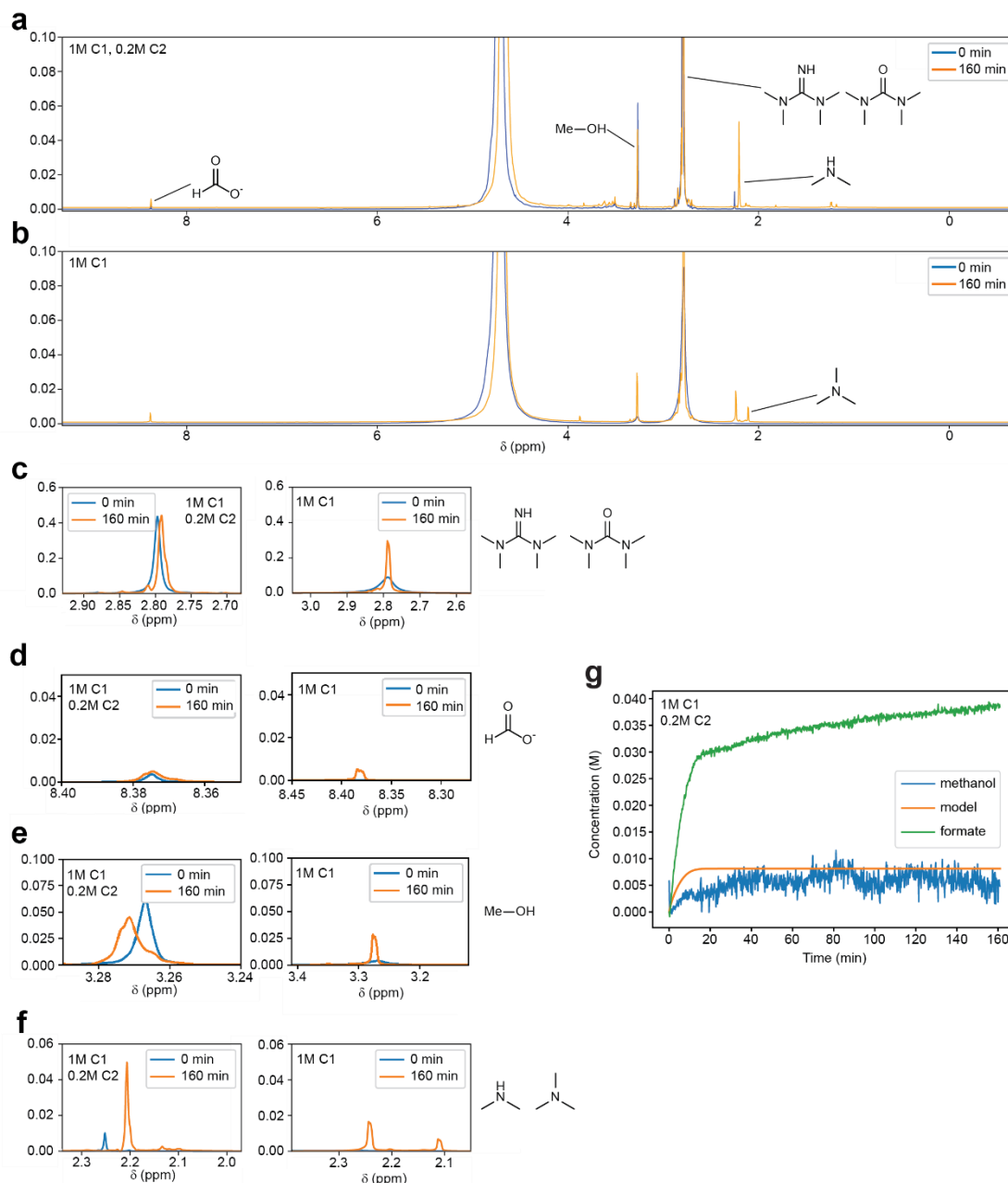
4.2.3. Extended Data Figures



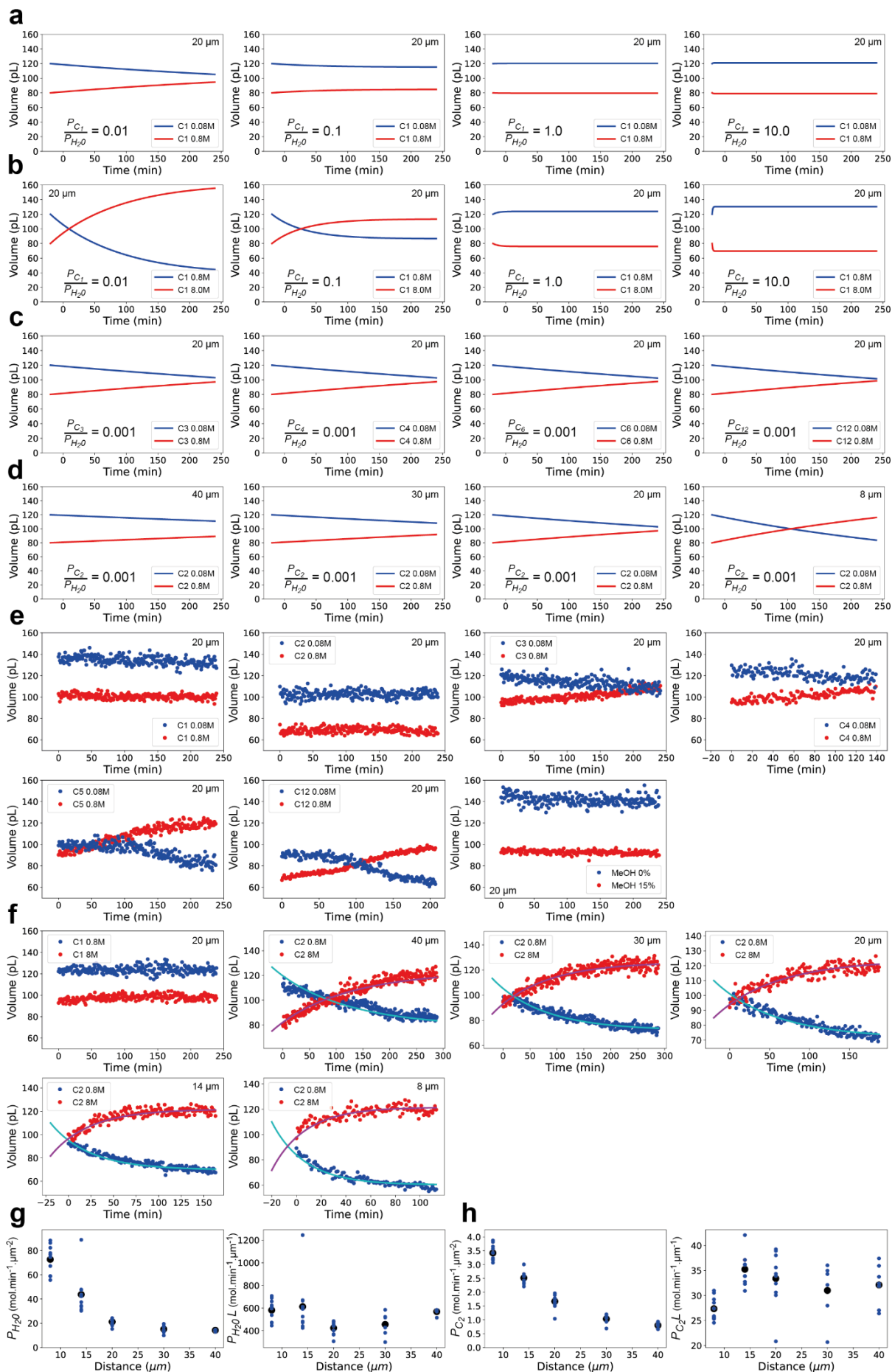
Extended Data Fig. 1. Detailed picture of the formose reaction system. The sub-set of reactions considered in the toy model of the formose reaction is indicated (yellow box). The reaction is catalysed by a base (in our experiments the superbase TMG) and Ca^{2+} (not shown). Aldol and hydride shift reactions (brown boxes), and hydration and cyclization reactions (pink boxes) are also indicated. The formose reaction system is modulated by a number of competing processes, including the Cannizzaro reaction (blue boxes), superbase hydrolysis (green boxes), the Eschweiler-Clarke reaction (orange box), the Mannich reaction (light blue box) and dynamic equilibria due to hydration and oligomerization (purple boxes).



Extended Data Fig. 2. Measurement and modelling of bulk formose reaction kinetics. a, Formaldehyde (C1) concentration measured using the Nash method (conversion of formaldehyde to Hantzsch pyridine)³⁹ versus time for three independent bulk reactions using standard formose reagents and 0.2 M C2, incubated at 40°C (Nash data) plus the curve for the best fit of the toy model (best fit) ($k_{add} = 2.8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ and $k_{cleave} = 0.06 \text{ min}^{-1}$), and curves with k_{add} and k_{cleave} increased and decreased by 2-fold, and with k_{add} increased by 4-fold. Note that the best overall fit (black curve) tends to slightly underestimate formaldehyde consumption between 5 to 10 minutes, whereas a 4-fold increase in k_{add} (dotted black curve) more closely predicts the data. This indicates that k_{add} is not determined accurately within this range, consistent with the experimental data for coupled formose droplets where the best fit of the toy model is found with a 4-fold increase in k_{add} (Fig. 1e). These fitted values are consistent with those determined previously under similar conditions²⁶. In particular, we recover the ratio $k_{add}/k_{cleave} = k_1/k_3 = 47$. We also have $k_{add} = [\text{OH}^-]k_1$ and $k_{cleave} = [\text{OH}^-]k_3$ from²⁶, where $k_1 = 2.98 \text{ M}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ and $k_3 = 0.2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. We recover our fitted values for $[\text{OH}^-] = 0.44 \text{ M}$, consistent with our conditions with 1 M of the superbases TMG where $[\text{OH}^-] \approx 1 \text{ M}$. **b,** As a, but showing the best fit of the toy model without and with the Cannizzaro reaction (no Cannizzaro and Cannizzaro, respectively) with the rate constant $k_{can} = 5.6 \cdot 10^{-3} [\text{OH}^-] = 2.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ from²⁶ using $[\text{OH}^-] = 0.44 \text{ M}$ for consistency as above. **c,** Density of glycolaldehyde (C2) as a function of concentration, showing the linearity of excess density with concentration.



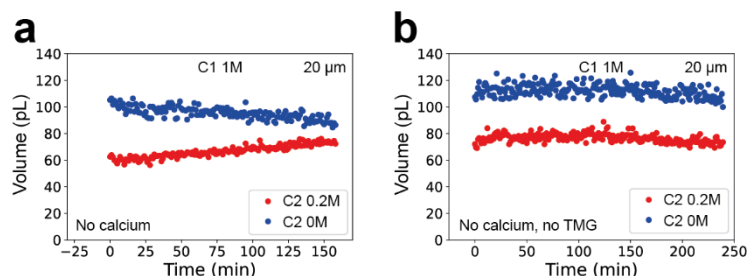
Extended Data Fig. 3. NMR analysis of bulk formose reaction. **a, b,** ^1H -NMR spectra after 0 min and 160 min incubation at 40°C using standard formose reagents (1M C1) with and without 0.2 M C2. **a,** 0.2M C2. **b,** No C2. Highlighted peaks are superbases (TMG) and products of the Cannizzaro reaction (formate and methanol), superbases hydrolysis (tetramethylurea, HNMe_2) and Eschweiler-Clarke reaction (NMe_3). **c,** Superbase (TMG) and degraded superbase (tetramethylurea). **d,** formate. **e,** methanol. **f,** HNMe_2 (by TMG degradation) and NMe_3 . **g,** Increase in concentration of formate and methanol (Cannizzaro reaction products) measured by NMR over time plus the curve from the toy model with the Cannizzaro reaction using $k_{\text{add}}=2.8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, $k_{\text{cleave}}=0.06 \text{ min}^{-1}$ and $k_{\text{can}}=5.6\cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (see [Extended Data Fig. 2](#)).



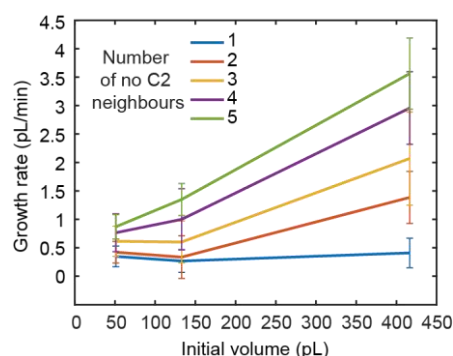
Extended Data Fig. 4. Transport of solutes and solvent between droplets in 1D droplet arrays. a-d, Modelling of droplet volume vs. time for pairs of droplets containing high and low

concentrations of solute using the transport model with the permeability of water through the oil phase, $P_{H_2O}L = 600 \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ ([Online Methods](#) and [Supplementary Information](#)). **a**, With different values of P_{C_1}/P_{H_2O} , where P_{C_1} is the permeability of the solute formaldehyde (C1) through the oil phase, 20 μm inter-droplet distance (centre-to-centre separation) and 0.8 M C1 (red lines) and 0.08 M C1 (blue lines). **b**, As a, but with 8 M C1 (red lines) and 0.8 M C1 (blue lines). **c**, With solutes of different molar volume, corresponding to formaldehyde (C1), glycolaldehyde (C2), and sugars with 3 to 12 carbons (C3, C4, C6 and C12) (see [Extended Data Table 2](#)) at 0.8 M (red lines) and 0.08 M (blue lines) concentration, $P_{C_n}/P_{H_2O} = 0.001$ and 20 μm inter-droplet distance. **d**, With different inter-droplet distances (40, 30, 20 and 8 μm), $P_{C_2}/P_{H_2O} = 0.001$ and 0.8 M C2 (red lines) and 0.08 M C2 (blue lines). **e-f**, Plots of droplet volume versus time from 1D droplet arrays in which alternating droplets contain a high and low concentration of solute. Solutes formaldehyde (C1), glycolaldehyde (C2), glyceraldehyde (C3), threose (C4), xylose (C5), sucrose (C12) and methanol (MeOH) were analysed. For each condition, the volume of a representative single droplet and the mean volume of its two nearest neighbours is shown. Data for all droplets and centre-to-centre droplet separations of 40 μm , 30 μm , 20 μm , 14 μm and 8 μm are shown in [Supplementary Figure 1](#) and confirm the dependence of osmotically driven volume changes on inter-droplet distance found in the model (panel d). **e**, Solute concentrations of 0.8M (red dots) and 0.08M solute (blue dots) for C1 to C12 and 15% (red dots) and 0% (blue dots) for MeOH, with 20 μm inter-droplet spacing. Meaningful volume changes were only detected for C3, C4, C5 and C12, indicating that $P_{C_{3-12}}/P_{H_2O} \leq 0.01$ (as in the model similar volume changes are only observed for $P_{C_1}/P_{H_2O} \leq 0.01$, see panel a, and different molar volumes of solutes has only a minor effect, see panel c). Indeed, the absence of meaningful volume change for C2 implies that $P_{C_{3-12}}/P_{C_2} \leq 0.01$ (as no meaningful volume change is observed in the model with $P_{C_1}/P_{H_2O} = 1.0$, see panel a). **f**, Solute concentrations of 8M (red dots) and 0.8M solute (blue dots) for C1 with 20 μm inter-droplet spacing and C2 with inter-droplet distances of 40 μm , 30 μm , 20 μm , 14 μm and 8 μm . No meaningful volume change was observed for C1, indicating that $P_{C_1} \geq P_{H_2O}$ (as no meaningful droplet volume changes are observed with the model when $P_{C_1}/P_{H_2O} \geq 1.0$, see panel b). However, important volume change was observed for C2, and the curves show the best fit for P_{H_2O} and P_{C_2} using the transport model. **g-h**, P_{H_2O} , and P_{C_2} by fitting experimental data for droplets containing C2 to the transport model (see panel f). **g**, P_{H_2O} as a function of the inter-droplet distance, L (left panel) and $P_{H_2O}L$ as a function of L (right panel). **h**, P_{C_2} as a function of the inter-droplet distance, L (left panel) and $P_{C_2}L$ as a function of L (right panel). In panels g and h each small blue point corresponds to data from a single droplet and the mean volume of its two nearest neighbours and the large black point is the mean value for all data points. The values of P_{H_2O} and P_{C_2} are inversely proportional to L , and $P_{H_2O}L$ and $P_{C_2}L$ are independent of L . The mean $P_{H_2O}L$ is $532 \pm 148 \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ (SD, N=43) and the mean $P_{C_2}L$ is $32 \pm 5 \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ (SD, N=43). The mean value of P_{C_2}/P_{H_2O} is 0.063 ± 0.013 (SD, N=43).

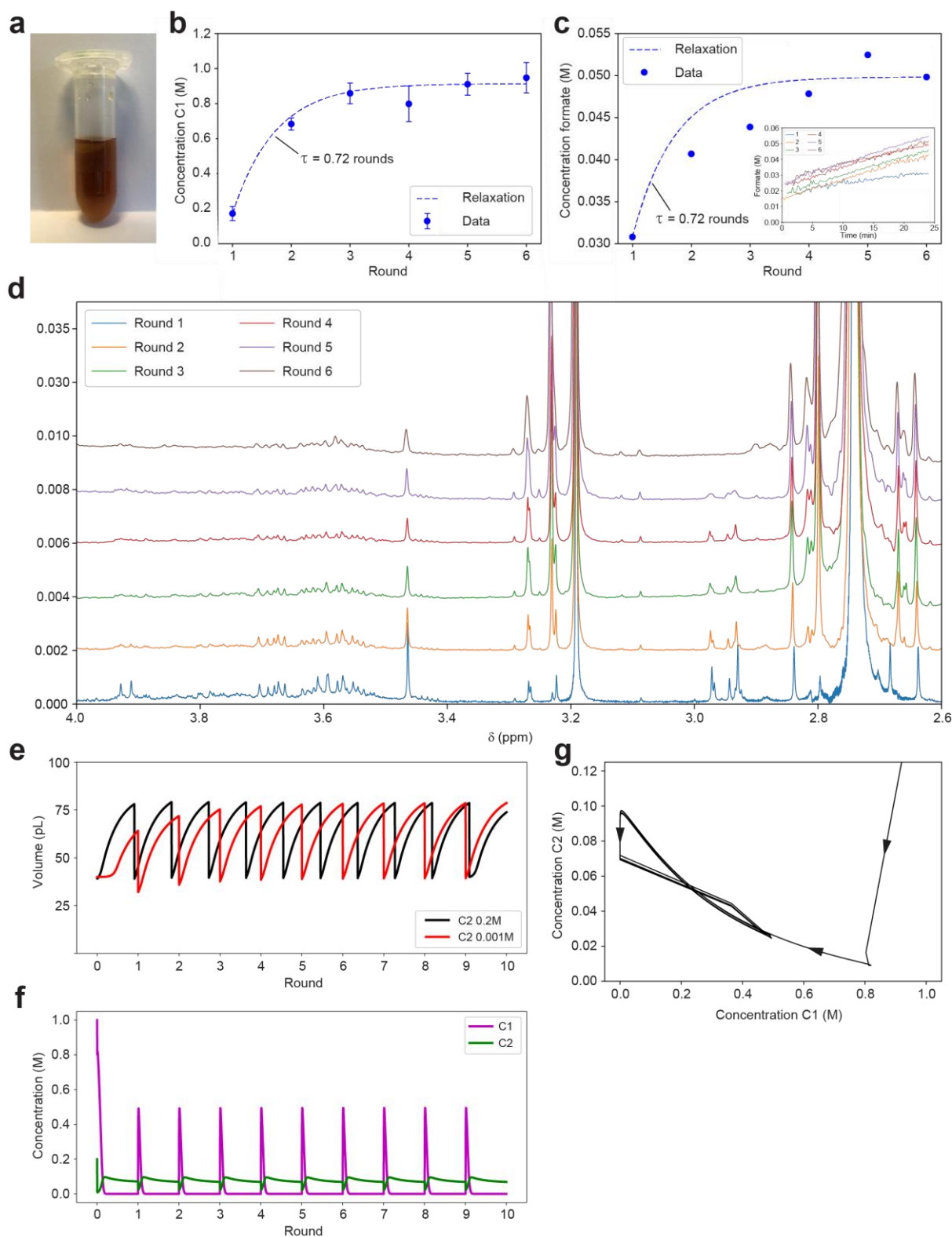
Assuming $P_{C_{3-12}}/P_{C_2} \leq 0.01$ (see above) this implies that $P_{C_{3-12}}/P_{H_2O} \leq 0.0006$.



Extended Data Fig. 5. Formose reaction in droplets in 1D droplet arrays. Plots of droplet volume versus time for alternating droplets containing formose reaction mixtures with 0.2M glycolaldehyde (C2 0.2M, red dots) and no glycolaldehyde (C2 0M, blue dots), at 40°C, but **a**, without CaCl₂ (No calcium), or **b**, without CaCl₂ and without TMG (No calcium, no TMG), with centre-to-centre droplet separation of 20 μm. For each condition, the volume of a representative single droplet and the mean volume of its two nearest neighbours is shown. Data for all droplets and centre-to-centre droplet separations of 30 μm, 20 μm, 14 μm and 8 μm are shown in [Supplementary Figure 2](#).

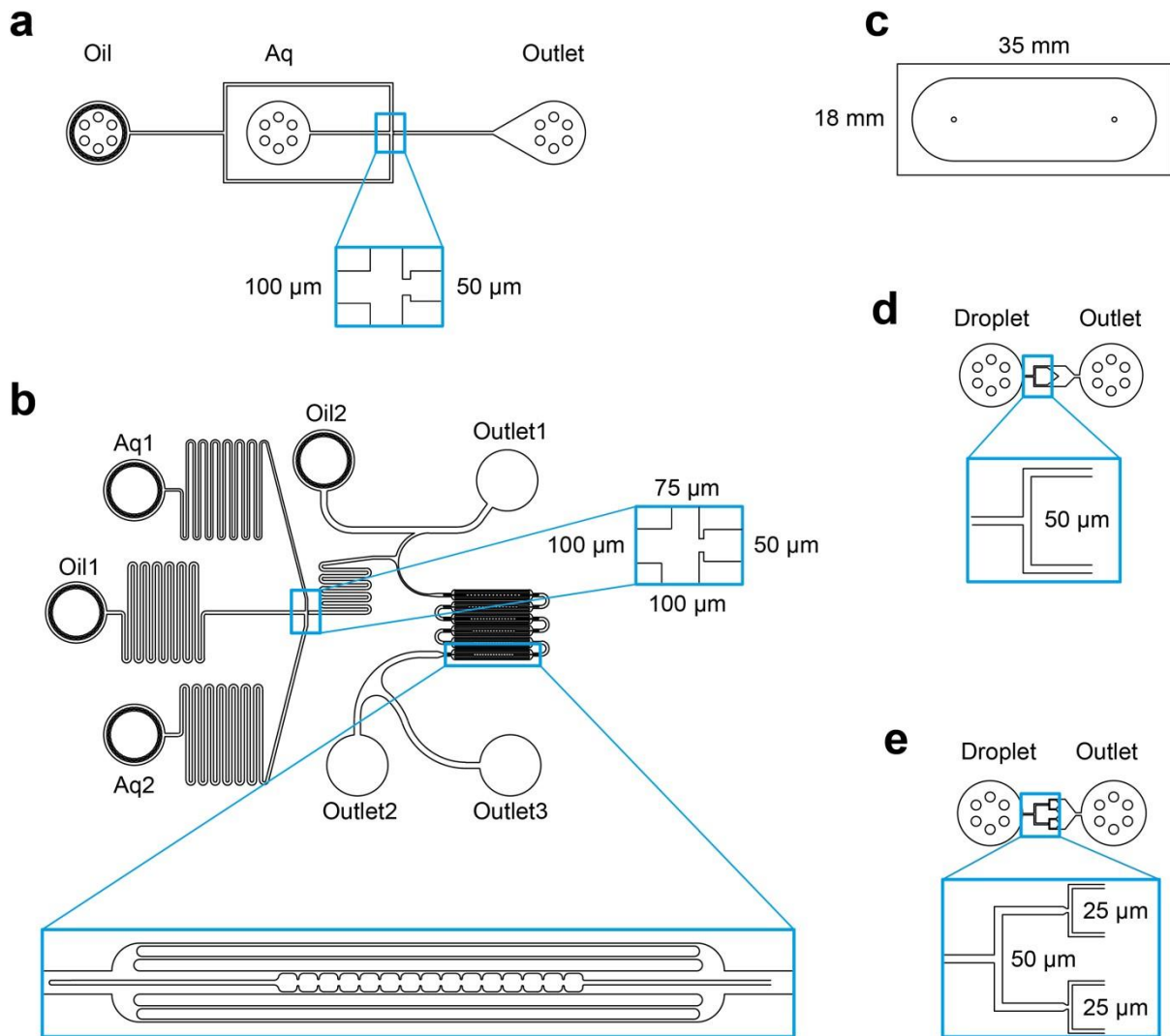


Extended Data Fig. 6. Size-dependence of droplet growth rate. 1:2 mixtures of 51, 133 and 416 pL aqueous droplets containing the standard formose reaction reagents (1 M formaldehyde (C1), 0.02 M CaCl₂ and 1M TMG) and, additionally, either 0.2 M glycolaldehyde (0.2 M C2) or no C2 (no C2) were incubated in a 2D droplet array for 1 h at 40°C. The growth rate of 0.2 M C2 droplets is plotted against initial volume for droplets with different initial numbers of no C2 neighbouring droplets (1 to 5).



Extended Data Fig. 7. Limit cycles in the formose reaction in bulk and in droplets. a, Image of a tube containing standard formose reagents supplemented with 0.2 M C2 after one month incubation at room temperature. The reaction mixture becomes brown and tar-like. **b-d**, Serial transfer of the bulk formose reaction. After 24 min incubation at 40°C, 20 μ L of standard formose reagents with 0.2 M C2 was transferred into 180 μ l of freshly prepared standard formose reaction reagents, and the procedure repeated 6 rounds in total. In each round, after the 24 min incubation, a sample was taken and analysed using the Hantzsch reaction (to measure the concentration of formaldehyde, C1), or by NMR. **b**, Concentration of formaldehyde (C1)

for each round of serial transfer. Relaxation is shown by the dashed line and the characteristic relaxation time, τ , is indicated. **c**, Concentration of formate (a product of the Cannizzaro reaction) for each round of serial transfer, determined by NMR. The inset shows the increase in formate concentration over time in each round. **d**, NMR spectra from 2.6 to 4.0 δ (ppm) for each round of serial transfer. Collectively, panels b-d show that by keeping the system out of equilibrium by serial dilution there is convergence to a limit cycle corresponding to maintained autocatalysis. **e-g**, Numerical analysis using the toy model of the formose reaction of variations in droplet volume, and concentration of C1 and C2 over multiple cycles of droplet growth and size-dependent division. The model analysed a pair of droplets: a 40 pL droplet containing standard formose reagents supplemented with either 0.2 M or 0.001 M C2 and an 80 pL droplet containing only containing standard formose reagents (no C2). After incubation for 260 min, the volume of the droplet initially containing C2 was divided by two at the end of incubation, and the droplet initially containing no C2 replaced by a fresh droplet containing standard formose reagents (no C2), and the operation repeated for multiple rounds. **e**, Volume of droplets initially containing 0.2 M or 0.001 M C2 versus time (in rounds). **f**, Concentration of C1 and C2 versus time (in rounds) for droplets initially containing 0.2 M C2. **g**, Concentration of C1 versus C2 for droplets initially containing 0.2 M C2. Collectively, panels e-g show that there is convergence to a limit cycle corresponding to maintained autocatalysis with convergence to the same limit cycle with initial concentrations of 0.2 M and 0.001 M C2 but more rapid convergence with 0.2 M than 0.001 M C2.



Extended Data Fig. 8. Microfluidic devices. **a**, Device i) to produce monodisperse droplets with a defined composition. **b**, Device ii) to produce alternating droplets of different volume and composition and incubate these droplets in 1D arrays. **c**, Device iii) to incubate droplets in 2D arrays. **d**, Device iv) to perform a single size-dependent droplet division. **e**, Device v) to perform a double size-dependent droplet division. Larger scale designs of important features are shown in blue boxes. See [Supplementary Files 1-6](#) for CAD files and Adobe Illustrator files for the devices.

4.2.4. Extended Data Tables

Extended Data Table 1. Robustness of the method to correlate the rate of change of droplet volume before and after division.

	Fraction of 0.2 M C2 droplets, f_d , reaching the threshold volume for division, v_d^1	Assuming all droplets divided ²	Assuming only droplets with volumes
--	--------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------	-------------------------------------

				$\geq v_d$ are divided ¹	
		r	p	r	p
All combinations of fresh no C2 neighbours ²	36.5%	0.643	$4.01 \cdot 10^{-8}$	$0.535 \square 0.079$	$3.00 \cdot 10^{-4} \square 7.03 \cdot 10^{-4}$
Six fresh no C2 neighbours ³	90.0%	0.926	$1.2 \cdot 10^{-4}$	$0.854 \square 5.1 \cdot 10^{-3}$	$4.20 \cdot 10^{-3} \square 5.10 \cdot 10^{-3}$

¹ With volumes $\geq v_d$, the threshold volume for division, immediately before division.

² The growth rate of droplets containing 1 M formaldehyde, 0.2 M glycolaldehyde, 1 M TMG and 0.02 M CaCl₂ (0.2 M C2 droplets) before size-dependent division, α_0 , was inferred from the initial droplet volume, v_0 , before division, and the initial droplet volume after division, v_1 , by applying the equation $\alpha_0 = 2(v_1 - v_0)/60$, assuming that all 0.2 M C2 droplets were divided. The measured growth rate after division, α_1 , was plotted against α_0 , and the best fit determined by linear regression (Fig. 3d,e). See [Online Methods](#). r is Pearson's correlation coefficient; p is the p -value.

Extended Data Table 2. Toy model of the formose reaction in droplets: parameters and their method of determination

Parameter	Variable	Value	Unit	Determination
Molar volume of water	v_{H2O}	$1.8 \cdot 10^{-3}$	L.mol ⁻¹	From molarity of water
Molar volume of formaldehyde	v_{C1}	$2.9 \cdot 10^{-3}$	L.mol ⁻¹	Winkelman et al. 2000 ⁴⁰
Molar volume of glycolaldehyde	v_{C2}	$4.1 \cdot 10^{-3}$	L.mol ⁻¹	From density, Extended Data Fig. 2c
Molar volume of $C_{n \geq 3}$	v_{Cn}	$v_{C1} + (n-1) \cdot 1.2 \cdot 10^{-3}$	L.mol ⁻¹	Extrapolated from C ₁ and C ₂

¹ To determine the robustness of the protocol and take into account that, in practice, not all 0.2 M C2 droplets reached the threshold volume for division, v_d , for a random fraction of droplets equal to the fraction, f_d , that reached v_d , the α_0 was calculated using the equation $\alpha_0 = 2(v_1 - v_0)/60$, the rest being calculated using the equation $\alpha_0 = (v_1 - v_0)/60$, plotted versus r_1 , fitted via linear regression, and this process repeated 50 times. r is Pearson's correlation coefficient; p is the p -value. Errors are \square 1 standard deviation.

² See Fig. 3b-d.

³ See Fig. 3e.

Rate constant for condensation	k_{add}	2.8	$M^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	Fitted from bulk Nash assay, Extended Data Fig. 2a
Rate constant for cleavage	k_{cleave}	0.06	min^{-1}	Fitted from bulk Nash assay, Extended Data Fig. 2a
Rate constant for Cannizzaro reaction	k_{can}	$2.5\cdot 10^{-3}$	$M^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	Derived from Socha et al. 1981 ²⁶ , Extended Data Fig. 2a
Permeability of water without formose	P_{H2O}	600/L	$\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{m}^{-2}$	Fitted from C_2 exchange data Extended Data Fig. 4f,g, L distance between droplets in μm .
Permeability of water in formose conditions	P_{H2O}	4000/L	$\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{m}^{-2}$	Fitted from formose reaction in droplets data Fig. 1e
Permeability of formaldehyde	P_{C1}	P_{H2O}	$\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{m}^{-2}$	Bounded from C_1 exchange data Extended Data Fig. 4b,f, L distance between droplets in μm .
Permeability of glycoaldehyde	P_{C2}	$0.05\cdot P_{H2O}$	$\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{m}^{-2}$	Fitted from C_2 exchange data Extended Data Fig. 4f,h
Permeability of $C_{n\geq 3}$	P_{Cn}	0	$\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{m}^{-2}$	Bounded $<0.01 P_{H2O}$ from $C_{3,4,12}$ exchange data Fig. 4a,e

4.2.5. Methods

Microfluidic device fabrication. Five microfluidic devices were used: i) to produce monodisperse droplets of defined composition, ii) to produce alternating droplets of different size and composition and incubate these droplets in 1D arrays, iii) to incubate droplets in 2D arrays, iv) to perform a single size-dependent droplet division, and v) to perform a double sizedependent droplet division (Extended Data Fig. 8, Supplementary Files 1-6). Devices i), iv), and v) were fabricated using soft-photolithography in poly-dimethylsiloxane⁴¹ (PDMS, Sylgard) as described⁴² with channel depths of 40 μm for device i), 20 μm for device iv) and 20 μm for device v). Device ii) was adapted from²⁷ and was a custom 3D printed glass microdevice (FEMTOprint). The 2 aqueous inlet channels were of equal length but different width (aq1 80 μm and aq2 100 μm), resulting in different hydrodynamic resistances. It contained 6 lines of droplet traps, each line containing 15 traps, with centre-to-centre distance between two neighbouring droplets of either 40 μm , 30 μm , 20 μm , 14 μm , or 8 μm . The main channel depth was 20 μm , and 15 μm deeper at each trap to immobilize the droplets by minimising surface energy²⁷. The fluidic connection between the chip and the tubing (see below) was made of PDMS by soft-lithography and bonded to the device by oxygen plasma treatment. Device iii) was adapted from⁴³, and contains a chamber of 60 μm depth, allowing immobilisation of 2D arrays of droplets. It was made of a glass microscope slide (75mm x 26 mm) attached to a cover slip (60 mm x 24 mm) using double-sided adhesive tape (Orafol, SDAG Adhésifs, series 1375). The tape was cut to define the shape of the reservoir (35 mm x 18 mm rectangle with a half circle at each end) using a cutting plotter (Graphtec; CE6000-40). An inlet hole and an outlet hole (diameter ~ 1 mm, Supplementary File m3) were pierced in the cover slip by ablation with

a CO₂ Laser (AxySLaser, C180 ii-CO₂). The fluidic connections were fabricated in PDMS, as for device ii). The glass slide and cover slip were treated with 15 μ L of 1H,1H,2H,2H-perfluorodecyltrichlorosilane (Sigma) by evaporation in a desiccator for 2h before attaching with pre-cut tape. The open reservoir was then loaded with emulsion (see Generation of 2D droplet arrays, below) and the device sealed by overlaying the cover slip with the fluidic connections and gently pressed to ensure uniform sealing. All other microfluidic devices were treated the day of the experiment with 5% v/v 1H,1H,2H,2H-perfluorodecyltrichlorosilane (Sigma) in Novec HFE-7100 fluorinated oil (3M), then flushed with nitrogen.

Microfluidic device operation. A 1 bar pressure-driven pump (Fluigent, MFCS-EZ) was used to control flow, connected to the microfluidic devices using PTFE tubing with an internal diameter of 0.56 mm and an external diameter of 1.07 mm (Fisher Bioblock Scientific).

Production of droplets of defined composition. Monodisperse droplets were produced by hydrodynamic flow-focusing⁴⁴ using device i). The aqueous phase was injected at 200 to 400 mbar producing droplets of 60 to 800 pL volume, dispersed in a continuous phase consisting of HFE-7500 fluorinated oil (3M) containing 2% (w/w) w/w 008-FluoroSurfactant (RAN Biotechnologies), a PFPE-PEG-PFPE amphiphilic tri-block copolymer²⁸, injected at 200 mbar. Droplets were collected at 4°C in a 200 μ l Eppendorf tube.

Generation of 1D droplet arrays. 1D droplet arrays were generated using device ii), essentially as described²⁷. Trains of droplets with alternating compositions were produced by flowing two aqueous phases (Aq1 and Aq2) to two opposing T-junctions with a cross-flowing stream of HFE-7500 fluorinated oil containing 2% (w/w) w/w 008-FluoroSurfactant (Oil1). Aq1 and Aq2 were injected at 180 mbar, and Oil1 at 130 mbar, generating alternating \sim 80 pL and \sim 120 pL droplets of different composition ([Supplementary Movie 1](#)), with the second oil inlet (Oil2), which controls the hydrodynamic switch, at 20 mbar. Once the droplet train was established, the pressure of Oil2 was increased to 200 mbar to re-direct the droplet train into the droplet traps ([Supplementary Movie 2](#)). The droplets buffer each other from one to the next trap ([Supplementary Movie 3](#)). Lowering Oil2 pressure to 0 mbar immediately stopped delivery of droplets to the traps. Following droplet loading, the pressure of Aq1, Oil1 and Oil2 were set to 0 mbar and, to block the flow of oil phase, one aqueous phase (deionized water) was injected at Aq2 at 100-200 mbar, and flowed to Outlet1, and a second aqueous phase (deionized water) was injected at Outlet2 at 30 mbar, and flowed to Outlet3. During droplet observation all inlets and outlets were set to 0 mbar except for Aq2 and Outlet 3, which were set to 20-30 mbar and 10-20 mbar, respectively.

Generation of 2D droplet arrays. A 40 μ L volume of the compact emulsion, produced using device i), was pipetted into the chamber of device iii) without the lid (cover slip with PDMS

fluidic connection) and then the device was closed with the lid, forming a compact 2D droplet array, in which droplets were immobilized by a slight physical confinement in the z-direction within the observation chamber⁸.

Droplet imaging. Microfluidic devices were placed on a thermostated microscope stage (Tokai Hit, TP-TIZH26) mounted on a Nikon Eclipse Ti2-E inverted microscope. Droplet production, operation of the hydrodynamic switch and droplet buffering were monitored using a Phantom v4.2 high-speed camera. To measure droplet volume changes over time a 4x objective was used to take bright field, green fluorescence and red fluorescence images every 15s using a Hamamatsu EMCCD C9100-03 camera and the software \square Manager (ImageJ).

Image analysis to measure the rate of change of droplet volume. Image analysis was performed using an in-house Matlab (MathWorks) script, calculating droplet volume as described previously⁸. The rate of volume change and initial droplet volumes were calculated by linear regression of the calculated volume versus time for each droplet. The coefficient of determination for individual droplets, r^2 , for both 1D and 2D droplet array experiments was typically ≤ 0.1 pL/min, smaller than the standard deviations observed for volume changes of different droplets with the same nearest neighbours and was not considered.

Measuring permeability of compounds in 1D droplet arrays. Solution Aq1, comprising a high concentration of compound to be tested (formaldehyde, glycolaldehyde, glyceraldehyde, threose, xylose, sucrose, or methanol), and solution Aq2, comprising a low concentration of the same compounds were held at 4°C and injected into device ii), as above (see [Extended Data Fig. 4](#) and [Supplementary Figure 1](#) for concentrations). The alternating ~ 80 pL droplets containing Aq1 and ~ 120 pL droplets containing Aq2 parked in the array were then incubated at 40°C for 4h to follow the change in volume over time.

Competition between droplets containing formose reactions in 1D droplet arrays. Solution Aq1, comprising 1 M formaldehyde, 0.2 M glycolaldehyde, 1 M 1,1,3,3-Tetramethylguanidine (TMG) and 0.02 M CaCl₂ and solution Aq2, comprising 1 M formaldehyde, 1 M TMG and 0.02 M CaCl₂ were held at 4°C and injected into device ii), as above. The alternating ~ 40 pL droplets containing Aq1 and ~ 80 pL droplets containing Aq2 parked in the array were then incubated at 40°C for 4h to follow the change in volume over time.

Competition between droplets containing formose reactions in 2D droplet arrays. Either 2 or 3 different populations of monodisperse droplets were generated separately using device i). The aqueous phase comprised either (i) 1 M formaldehyde, 0.2 M glycolaldehyde, 1 M TMG and 0.02 M CaCl₂, (ii) 1 M formaldehyde, 0.05 M glycolaldehyde, 1 M TMG and 0.02 M CaCl₂, or, (iii) 1 M formaldehyde, 1 M TMG and 0.02 M CaCl₂. The initial composition of droplets

was tracked by leaving one of the aqueous phases unlabelled, and adding 10-fold diluted 5 μm diameter green fluorescent or red fluorescent silica particles (DNG-L034 and DNG-L033, respectively, Creative Diagnostics) to the other aqueous phases. Droplets were collected in a 200 μL Eppendorf tube at 4°C, allowed to cream spontaneously, sampled using a micropipette, combined in the desired ratio in a total volume of 40-50 μl , mixed by pipetting 20-25 μl up and down 6 times using a micropipette, and allowed to cream spontaneously, forming a compact emulsion. A 40 μL volume of the compact emulsion was transferred to device iii), as described above, forming a compact 2D droplet array, which was incubated at 40°C for 1h to follow the change in volume over time.

Translating differences in droplet growth into differences in fitness. Two populations of monodisperse droplets were generated separately using device i). The aqueous phase used to produce the droplets comprised either i) 1 M formaldehyde, 0.2 M glycolaldehyde, 1 M TMG and 0.02 M CaCl_2 , or, ii) 1 M formaldehyde, 1 M TMG and 0.02 M CaCl_2 . The droplet composition was tracked by leaving the aqueous phase containing 0.2 M glycolaldehyde unlabelled and adding either 0.05% carbon black or 10-fold diluted 5 μm diameter red fluorescent silica particles to the aqueous phase with no glycolaldehyde. Droplets were collected in a 200 μL Eppendorf tube at 4°C, allowed to cream spontaneously, and then volumes of the creamed emulsions were mixed, as above, to give a 1:1 or 1:2 ratio of droplets containing 0.2 M glycolaldehyde to droplets containing no glycolaldehyde, and 40 μL transferred into device iii), forming a compact 2D droplet array, which was incubated at 40°C for 1 to 4 h to follow the change in volume over time. After incubation, droplets were recovered from device iii) by injecting HFE-7500 fluorinated oil without surfactant at 20 mbar, allowed to cream spontaneously at 4°C and injected into either device iv) to perform a single size-dependent droplet division, or device v) to perform a double size-dependent droplet division. In both cases, droplets, which completely obstruct the microfluidic channel, were driven towards a T-junction, where droplets over a threshold volume were divided symmetrically at each T-junction (see also [Supplementary Information](#))³⁰. Size-dependent division of droplets was followed in bright field using a high-speed camera, with droplets containing no glycolaldehyde labelled with carbon black. After a single size-dependent division, with droplets containing 0.2 M glycolaldehyde labelled with red fluorescent silica particles, the droplets were collected in a 200 μL Eppendorf tube at 4°C, allowed to cream spontaneously, combined in a 1:2 or 1:10 ratio with droplets containing 1 M formaldehyde, 1 M TMG and 0.02 M CaCl_2 plus 10-fold diluted 5 μm diameter green fluorescent silica particles, freshly produced using device i), and 40 μL transferred to device iii), forming a compact 2D droplet array, which was incubated at 40°C for 1 h to follow the change in volume over time.

Correlating the rate of change of droplet volume before and after division. The growth rate of droplets containing 1 M formaldehyde, 0.2 M glycolaldehyde, 1 M TMG and 0.02 M CaCl_2 (0.2 M C2 droplets) before size-dependent division, α_0 , was inferred from the initial droplet volume before division, v_0 , and the initial droplet volume after division, v_1 , by applying the

equation $\alpha_0 = 2(v_1 - v_0)/60$, assuming that all 0.2 M C2 droplets were divided. The measured growth rate after division, α_1 , was plotted against α_0 , and the best fit determined by linear regression. The robustness of the protocol, taking into account that, in practice, not all 0.2 M C2 droplets reached the threshold volume for division, v_d , was tested ([Extended Data Table 1](#)).

Measuring formose reaction kinetics using the Hantzsch reaction. Formaldehyde was measured using a colorimetric assay based on the Hantzsch reaction, developed by Nash³⁹. The formose reaction was performed with 1 M formaldehyde (C1), 0.2 M glycoaldehyde (C2), 0.02 M CaCl₂ and 1M TMG, at 40°C for 20 min. At the beginning of the reaction, and at 1 min intervals, a 20 μ L sample was diluted into 180 μ L deionized water in a 96-well plate. Then 20 μ L of the diluted sample was transferred to another 96-well plate with 180 μ L deionized water to achieve a final dilution of 100-fold and kept on the ice. After taking the sample for all the time points, 5 μ L of the final dilution from each point was transferred to a 96-well plate with 195 μ L of Nash reagent (2 M ammonium acetate, 0.3 % v/v acetic acid and 1% v/v acetyl acetone) and heated at 58°C for 12 min. Finally, absorbance was measured at 412 nm. Formaldehyde concentrations was determined using a calibration curve constructed with 3, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, and 0 M formaldehyde.

Measuring formose reaction kinetics using nuclear magnetic resonance (NMR). A 5 mm NMR tube was filled with 250 μ L of 1 M formaldehyde (C1), 0.2 M glycoaldehyde (C2), 0.02 M CaCl₂ and 1M TMG in H₂O:D₂O 90:10 (v:v), or the same mixture without C2. The sample was loaded into the NMR spectrometer, and 1D ¹H-NMR spectra were recorded at intervals of 11.28 s at 40°C. The acquisition time was 1.3s for each free induction decay (FID). The FIDs were multiplied with an exponential function (line-broadening of 1 Hz) before Fourier transformation. The time evolution of the reaction was followed by numerically integrating several regions of the spectra. Due to the high sensitivity of the chemical shift of the water (and hence of the lock signal) to the changing pH, the position of the different resonances varied strongly during the reaction. A shift was applied so that the signal of formate remained constant at 8.3 ppm. Since not every signal has exactly the same dependence on the pH, the integration regions were chosen to be large enough to fit any residual variation of the chemical shifts after the correction. All experiments were carried out on a wide bore Bruker Avance IIIHD spectrometer operating at 800.1 MHz (proton resonance frequency) and equipped with a roomtemperature TXI probe equipped with tripe-axis gradients.

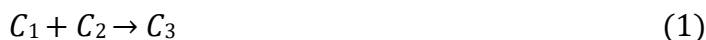
Serial dilution of the bulk formose reaction. An Eppendorf tube containing 200 μ L of 1 M formaldehyde (C1), 0.2 M glycoaldehyde (C2), 0.02 M CaCl₂ and 1M TMG was incubated at 40°C. After 24 min, 20 μ L of the reaction mixture was transferred into 180 μ L of freshly prepared 1 M formaldehyde (C1), 0.02 M CaCl₂ and 1M TMG, and the procedure repeated 6 rounds in total. In each round, after the 24 min incubation, a 20 μ L sample was taken and the concentration of formaldehyde was measured using Hantzsch reaction, as described above. Likewise, an NMR tube was filled with 500 μ L of 1 M formaldehyde (C1), 0.2 M glycoaldehyde (C2), 0.02 M CaCl₂ and 1M TMG in H₂O:D₂O 90:10 (v:v) and analysed by NMR over 24 min

at 40°C, as above. After 24 min, 50 μL of the reaction mixture was transferred into 450 μL of freshly prepared 1 M formaldehyde (C1), 0.02 M CaCl_2 and 1M TMG, and the procedure repeated 6 rounds in total.

Toy model of the formose reaction. The model integrates fluxes of species due to gradients between droplets and osmosis, and simplified dynamics of the autocatalytic formose reaction. Exchange currents from droplet A to droplet B (in $\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) are proportional to concentration differences (Fick's law), more conveniently expressed for our purpose using molar fractions as $J_X = \pi_X \cdot (x_X^A - x_X^B)$ for $X = \text{H}_2\text{O}, \text{C}_1, \text{C}_2, \dots, \text{C}_n$, with x_X^A (x_X^B) molar fraction of X in A (resp. B) and π_X permeability of X through the oil phase (π_X comprises the total concentration as a nearly constant factor for the conversion between molar fractions and concentrations). To account for the impact of droplet size variation on fluxes and channel geometry, we use a form

$$\pi_X = P_X(L)A_{red}$$

where P_X has an experimentally verified L^{-1} dependence ([Extended Data Fig. 4g,h](#)) and $A_{red} = \frac{V_A^{2/3}V_B^{2/3}}{V_A^{2/3}+V_B^{2/3}}$ is a reduced (effective) area of exchange between the droplets. The toy model of the formose reaction has minimal ingredients for autocatalysis⁶:



Consistent with²⁶ (1) and (2) are taken to be irreversible with a rate constant k_{add} , the same rate being used for the reverse of reaction (3). The limiting step is the forward reaction of (3), denoted k_{cleave} . We have checked that Cannizzaro side-reactions have a negligible impact on the dynamics ([Extended Data Fig. 2b](#)). Assuming that the exchange of $\text{C}_{n \geq 3}$ is negligible over the time course of the experiment, the equations for the dynamics of two coupled droplets $i = A, B$ containing formose reactions are:

$$\frac{dn_{H2O}^i}{dt} = \varepsilon_i J_{H2O}$$

$$\frac{dn_1^i}{dt} = \varepsilon_i J_1 - \bar{k}_{add} x_1^i x_2^i - \bar{k}_{add} x_1^i x_3^i$$

$$\frac{dn_2^i}{dt} = \varepsilon_i J_2 - \bar{k}_{add} x_1^i x_2^i + 2 \bar{k}_{cleave} x_4^i - 2 \bar{k}_{add} x_2^{i^2}$$

$$\frac{dn_3^i}{dt} = \bar{k}_{add} x_1^i x_2^i - \bar{k}_{add} x_1^i x_3^i$$

$$\frac{dn_4^i}{dt} = \bar{k}_{add} x_1^i x_3^i - \bar{k}_{cleave} x_4^i + \bar{k}_{add} x_2^{i^2}$$

With n_X^i number of moles of X in droplet i ; $x_X = n_X^i/n_{tot}^i$ molar fraction; v_X molar volume;

$V_i = \sum_{X=H2O,C1,C2,C3,C4} n_X^i \cdot v_X$, volume of droplet i ; $i = -1$ if $i = A$ and $i = 1$ if $i = B$; rate constants

$\bar{k}_{add} = n_{tot}^i C_{tot} k_{add}$ (C_{tot} the total molarity of the solution) and $\bar{k}_{cleave} =$

$n_{tot}^i k_{cleave}$ are expressed for mole changes as a function of molar fractions. Parameters and their method of determination are reported in [Extended Data Table 2](#). For further details see [Supplementary Information](#). The annotated code is available as [Supplementary File 7](#). The dimensionless number $k_{cleave} c_0 D / P_{C2}$ used in [Fig. 1c](#) is obtained by multiplying the limiting reaction rate k_{cleave} by the characteristic time τ_{C2} of transport between a droplet with C_2 in water coupled to a droplet without C_2 . The initial flux is given by $\pi c_2 x_{C2}$ in $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ with the molar fraction $x_{C2} \approx n_{C2} / n_{H2O}$. The typical time to transport the n_{C2} moles at this flux is $\tau_{C2} =$

$n_{C2} / (\pi c_2 x_{C2}) = n_{H2O} / (P_{C2} A_{red}) \approx c_0 D^3 / (P_{C2} D^2) = c_0 D / P_{C2}$ where D is the droplet diameter. Numerically, in the experimental conditions, we have $\tau_{C2} \approx 19$ min so that

$$k_{cleave} c_0 D / P_{C2} = k_{cleave} \tau_{C2} = 1.13.$$

References specific to extended data and methods

- 39 Nash, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem J.* **55**, 416-421 (1953).
- 40 Winkelman, J. G. M. & Beenackers, A. A. C. M. Correlations for the Density and Viscosity of Aqueous Formaldehyde Solutions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **39**, 557-562 (2000).
- 41 Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J. & Whitesides, G. M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.* **70**, 4974-4984 (1998).
- 42 Mazutis, L. *et al.* Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat. Protoc.* **8**, 870-891 (2013).
- 43 Eyer, K. *et al.* Single-cell deep phenotyping of IgG-secreting cells for high-resolution immune monitoring. *Nat. Biotechnol.* **35**, 977-982 (2017).

- 44 Anna, S. L., Bontoux, N. & Stone, H. A. Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. *Appl. Phys. Lett.* **82**, 364-366 (2003).

4.2.6. Supplementary Information

4.2.6.i. Supplementary Text

Toy model of the formose reaction

Preliminary considerations on formaldehyde C₁ and other C_n in water

In aqueous solutions, C_n species are not present in their free aldehyde form but rather as hydrated monomers and oligomers (e.g., dimers of C₂)^{1,2}. The different forms may differ in their molar volumes and exchange properties, overall affecting total volume dynamics and permeability. We do not intend to model the detailed dynamics of these states. We instead consider fast equilibrium compared to reaction and exchange rates, and the dominance of hydrated monomer. Indeed, for C₁, Rivlin et al.² obtain the respective equilibrium constants of hydration and dimerization $K_{hyd} \approx 1000$ and $K_{dim} \approx 10$ for molar fractions x , leading to $x_{hyd} \approx 1000 x_{free} \approx x_{total} \approx 1/55 \approx 0.02$ and $x_{dimer} \approx 10 x_{hyd} \approx 0.003$. This allows us to use an average molar volume accounting for the contribution of all forms of C_n, consistent with the linearity of excess density with concentrations for C₁ as measured by Winkelman et al.¹, and for C₂ as measured by us ([Extended Data Fig. 2c](#)). Given ρ_X densities, φ_X volume fractions, μ_X molar masses, the effective molar volumes v_X are obtained from:

$$\rho = \rho_X \varphi_X + \rho_{H_2O} \varphi_{H_2O} = \mu_X c_X + \rho_{H_2O} (1 - c_X v_X) = \rho_{H_2O} + (\mu_X - \rho_{H_2O} v_X) c_X$$

where $\rho_{H_2O} = 1 \text{ kg.L}^{-1}$. For C₁, the tabulated value $\mu_{C_1} = 0.03 \text{ kg.mol}^{-1}$ and the slope of excess density with concentrations from Winkelman et al.¹ give $v_{C_1} = 2.9 \cdot 10^{-3} \text{ L.mol}^{-1}$. For C₂, the tabulated value $\mu_{C_2} = 0.06 \text{ kg.mol}^{-1}$ and the slope of excess density with concentrations from [Extended Data Fig. 2c](#) give $v_{C_2} = 4.1 \cdot 10^{-3} \text{ L.mol}^{-1}$. For larger species ($n \geq 3$), we extrapolated the contribution of each additional carbon to the molar volume as a term $v_{C_2} - v_{C_1}$.

Transport between droplets

We exploit the symmetry of the setup where two types of droplets (A and B) alternate along a 1D array, so that away from edges, exchanges between a single pair are representative of the overall dynamics. Exchange currents from A to B (in mol.min⁻¹) are described as:

$$J_X = \pi_X \cdot (x_{XA} - x_{XB}),$$

where X is a chemical species (among H_2O , C_1 , C_2 , ..., C_n), x_{XA} is the molar fraction of X in A, x_{XB} is the molar fraction of X in B, and π_X is the permeability of X through the oil phase. π_X depends on the partition constant of X between the aqueous and oil phase, and the geometry of the diffusion process. The latter depends on droplet shapes and channel geometry. In all generality, geometric contributions are accounted as a factor $S_i F_{i,j}$ where the $F_{i,j} \leq 1$ is the so-called view factor and is the proportion of the flux leaving i for j , where each index can take on of the values of A or B. We approximated such geometric contribution using the view factor between two disks of different diameters³. In free space and at first order in r/L , this geometric factor is found to be A_{red}/L^2 , where r the typical disk diameter and $A_{red} = S_A S_B / (S_A + S_B)$ is a reduced area. To take into account the channel confinement (as opposed to free space), one may replace a scale L by a characteristic size of the channel resulting in a L^{-1} dependence for π_X . This dependence is well verified experimentally ([Extended Data Fig. 4g,h](#)). In fine, we have the form:

$$\pi_X = P_X \cdot A_{red}$$

where the S_i entering in A_{red} scale as $V_i^{2/3}$ and P_X varies in L^{-1} . Note that A_{red} can alternatively be understood as the simplest symmetrical function such that A_{red}/S_i is bounded for $i = A$ or B . Note that A_{red} contributes to less than 10% to flux variations in the range of volume changes we explore. P_X should be interpreted here as an effective permeability per unit of area given that only a certain fixed fraction (the free aldehyde form, see section above) of total X is prone to exchange among all those at equilibrium in solution.

The ratio P_{C_2}/P_{H_2O} is fitted from the time courses of volume changes in experiments each involving only C_2 water with fixed initial concentration difference between droplets A and B, measured for a range of distances L between them. We verified experimentally that C_1 exchanges at least as fast as water ([Extended Data Fig. 4b,f](#)), thus we take $P_{C_1} = P_{H_2O}$. We verified experimentally that $P_{C_{n \geq 3}}$ is slow enough to be neglected ([Extended Data Fig. 4e](#)). Note that P_{H_2O} is fitted separately in exchange experiments with only C_2 and water, and in experiments involving the formose reaction as TMG may modulate P_{H_2O} .

Autocatalytic reaction

Our aim is to provide a minimal model, with sufficient ingredients to reproduce and study the phenomenology of coupled compartments containing autocatalytic reactions. We therefore opt for a simplified description of the formose reaction, which is reality a highly complex reaction network comprising up to at least C_8 species and entangled reaction cycles⁴. It, however, relies on a minimal autocatalytic core made of a cycle comprising C_2 to C_4 species with C_1 as a feedstock⁵, as originally proposed⁶:



Following the estimates of Socha et al.⁷, under conditions very similar to ours, C_1 additions in (1) and (2) are taken to be irreversible with a rate constant k_{add} , the same rate being used for the reverse of reaction (3) (addition of two C_2). The overall limiting step is the forward reaction of (3), denoted k_{cleave} . This ‘toy-model’ was fitted to the time course of C_1 . It recovers the two phases of the kinetics, with a first rapid decay controlled by k_{add} (during the first few minutes), followed by a slower decay controlled by k_{cleave} . Note that our fitted values agree closely with those found in⁷ (see [Extended Data Fig. 2](#)).

Note that, in addition to autocatalysis, the formose species are subject to degradative pathways dominated by the Cannizzaro reaction⁷. The latter should be taken into account in the absence of initially provided C_2 as in this case autocatalysis does not start, or starts after a very long waiting time, so that only the Cannizzaro reaction occurs. However, the rate constant of the Cannizzaro reaction k_{can} is 500 times smaller than k_{add} ⁷ so it should have a negligible contribution once autocatalysis has started. Consistently, we verified numerically that adding this reaction has a barely visible effect on the overall kinetics ([Extended Data Fig. 2b](#)), consistent with the experimentally measured amplitude of methanol accumulation from the Cannizzaro reaction ([Extended Data Fig. 3g](#)).

Equations of the dynamics

Given all the above considerations, the dynamics of two droplets A and B containing formose reactions and coupled through a semi-permeable continuous phase is simulated numerically using a set of coupled dynamical equations, assuming that the exchange of $C_{n \geq 3}$ is negligible over the time course of the experiment:

$$\frac{dn_{H_2O}^i}{dt} = \varepsilon_i J_{H_2O}$$

$$\frac{dn_{C_1}^i}{dt} = \varepsilon_i J_{C_1} - \bar{k}_{add} x_{C_1}^i x_{C_2}^i - \bar{k}_{add} x_{C_1}^i x_{C_3}^i$$

$$\frac{dn_{C_2}^i}{dt} = \varepsilon_i J_{C_2} - \bar{k}_{add} x_{C_1}^i x_{C_2}^i + 2 \bar{k}_{cleave} x_{C_4}^i - 2 \bar{k}_{add} x_{C_2}^{i^2}$$

$$\frac{dn_{C_3}^i}{dt} = \bar{k}_{add} x_{C_1}^i x_{C_2}^i - \bar{k}_{add} x_{C_1}^i x_{C_3}^i$$

$$\frac{dn_{C_4}^i}{dt} = \bar{k}_{add} x_{C_1}^i x_{C_3}^i - \bar{k}_{cleave} x_{C_4}^i + \bar{k}_{add} x_{C_2}^{i^2}$$

With

- n_X^i number of moles of X in droplet $i = A, B$;
- $x_X = n_X^i / n_{tot}^i$ molar fraction;
- v_X molar volume;
- $V_i = \sum_{X=H_2O, C_1, C_2, C_3, C_4} n_X^i \cdot v_X$, volume of droplet i ;
- $c_X^i = n_X^i / V_i$ concentration;
- $i = -1$ if $i = A$ and $i = 1$ if $i = B$
- $J_X = P_X(L) \cdot \frac{V_A^{2/3} V_B^{2/3}}{V_A^{2/3} + V_B^{2/3}} \cdot (x_X^A - x_X^B)$ flux from A to B.

We express here the rates of change of moles per droplet as this is more convenient to model the exchange fluxes and volume changes. Correspondingly, we use the modified rates $\bar{k}_{add} = n_{tot}^i C_{tot} k_{add}$ ($C_{tot} \approx 55 \text{ mol}$ is the total molarity of the solution) and $\bar{k}_{cleave} = n_{tot}^i k_{cleave}$, where k_{add} and k_{cleave} are the rate constants that would be used for kinetics expressed using concentrations, as reported in [Extended Data Table 2](#).

Parameters of the dynamics

Parameters and their method of determination are reported in [Extended Data Table 2](#). Note that the permeability of water in formose conditions is the only fitting parameter for formose reaction experiments in droplets ([Fig. 1e](#)), relative permeabilities of other species being measured in independent exchange experiments and assumed to be preserved, reaction rate constants being determined from bulk experiments.

Division of droplets by shear stress

Shear forces have previously been proposed as a mechanism to preferentially divide larger membrane-bound compartments⁸. This mechanism can also apply to droplets, since shear stress, which is responsible for droplet deformation and division, has to overcome the characteristic Laplace pressure, σ/R , where σ is the surface tension and R is the droplet's radius, which tends to restore the spherical shape, making it more easy to split larger than smaller droplets⁹. Droplets can be divided in a size-dependent manner, for example, by passing through a porous medium¹⁰. Here we used a microfluidic porous medium system for controlled size-dependent division ([Online Methods](#))¹⁰: droplets, which completely obstruct the microfluidic channel, were driven towards a T-junction, where extensional flow drives the droplets to deform (extend) and divide symmetrically due to Rayleigh-Plateau instability if extension = $l_e/(\pi w_e) \geq 1$, where l_e and w_e are, respectively, the stretched droplet's length and width. As larger droplets are more easily deformable than smaller droplets due to lower σ/R , only droplets over a critical size, which is mostly controlled by the geometry, are divided¹⁰.

Differences in droplet growth rates before and after division

In the experiments shown in [Figure 3b-d](#), no C2 droplets (red fluorescent) and 0.2 M C2 droplets (unlabelled) were mixed in a 2:1 ratio, incubated for 1h at 40°C in a 2D droplet array, and passed through a single T-junction to selectively divide droplets that had doubled in volume. Fresh reagents were then provided by adding a 2-fold excess of fresh no C2 droplets (green fluorescent) and the droplets re-incubated for 1h at 40°C in a 2D droplet array. Before division, the 0.2 M C2 droplets increased in volume, while the no C2 droplets decreased in volume, with a rate depending on the neighbouring droplets as already observed ([Fig. 3b, top](#); [Fig. 3c](#); [Supplementary Movie 9](#)). After division, the mean growth rate of 0.2 M C2 droplets was on average, 3.83-fold higher than before division, whereas droplets with no C2 before division grew very slowly ([Fig. 3b, bottom](#); [Fig. 3c](#), [Supplementary Movie 10](#)). The increased growth rate of 0.2 M C2 droplets may be partly due to their 1.4-fold higher average initial volume since growth rate of droplets with identical composition and neighbouring droplets increases with the volume, ([Extended Data Fig. 6](#)). However, the observed increase in growth rate would require a several fold difference in volume, and must, therefore, also result from differences in composition. The slow growth of no C2 droplets is likely due to a small influx of C2 from neighbours before division which enhanced autocatalysis or accumulation of side-products such as formate from the Cannizzaro reaction which caused osmotic imbalance.

Links to models of protocells and evolution

Gánti's chemoton theory¹¹⁻¹³ foresaw an infrabiological reproducing organisation¹⁴ comprising autocatalytic metabolism (realised, for example, by the formose reaction) coupled to membrane growth^{15,16}. We show that the formose reaction can indeed be coupled to compartment growth and division and our system shares several features with Gánti's self-reproducing microsphere

model: autocatalytic metabolism, leading to compartment growth that due to physical effects results in compartment-level reproduction, hence emergent fitness at the compartment level. However, our system differs from Gánti's proposal in two important ways: metabolism drives compartment growth simply by osmosis (there is no need for metabolism to synthesise constituents of an encapsulating membrane) and we implement an explicit competitive setting.

Major transitions¹⁷ unfold in the “ecological theatre”¹⁸, hence both the infra- and supraindividual levels of dynamics should be addressed together, both theoretically and experimentally, as in the present study. Competition for a common resource among molecular replicators has been addressed before by models of quasispecies¹⁹, hypercycles²⁰, and surfacebound coupled replication-metabolic systems²¹.

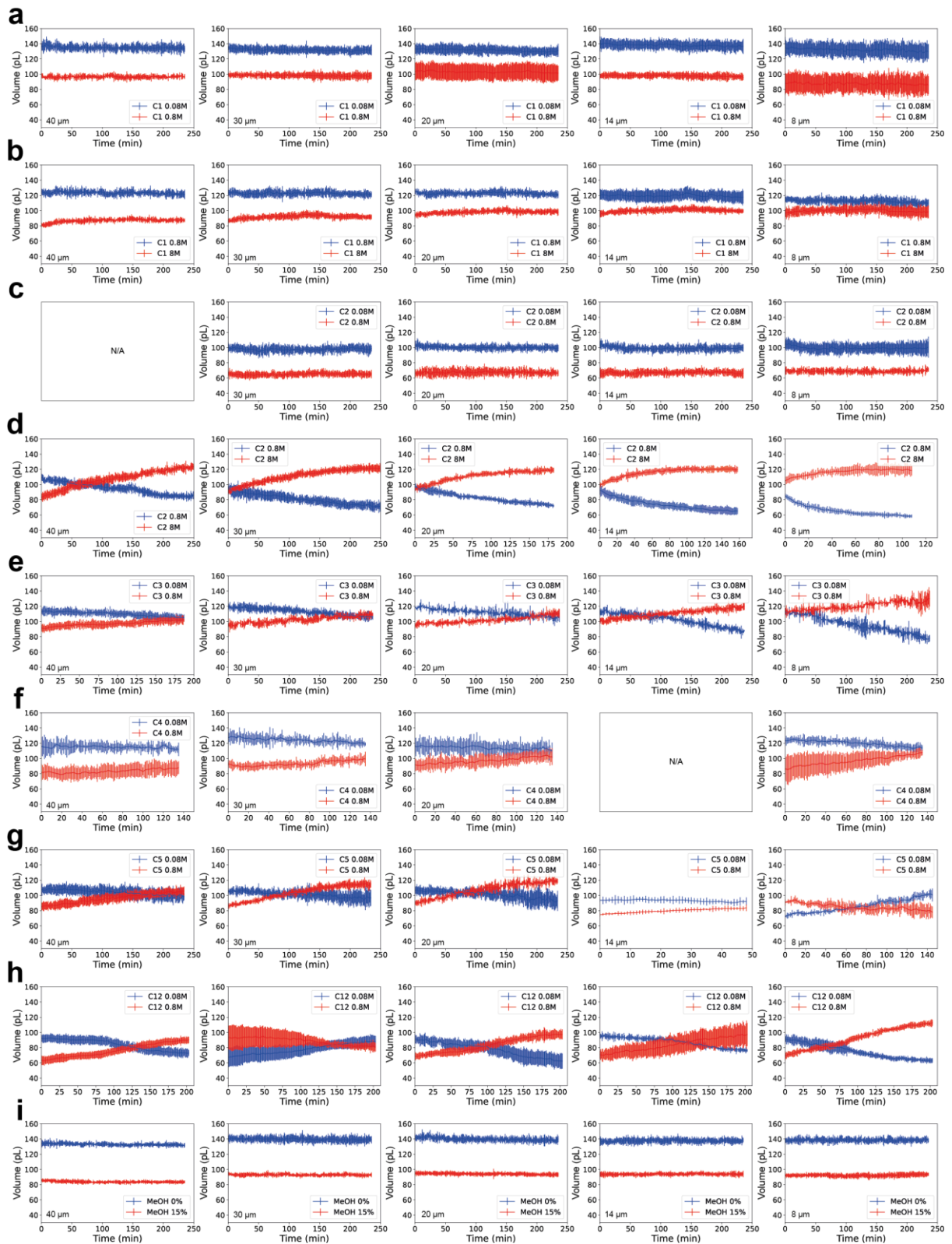
Our results show the phenotypic plasticity²² of a compartmentalised non-biological replicator and might be interpreted as simply measuring the “reaction norm”²² (the phenotype pattern of the same genotype across different environments) of the same replicator. However, four factors point to the possibility of even richer behaviour and semantics: (i) competitive dynamics among the droplets, enforced by the population structure, leads to diversification, (ii) since we are dealing with the equivalent of a “unicellular lifecycle”, the phenotypic alterations can readily be inherited for a certain number of generations (as a form of transient “non-genetic inheritance”) due to material overlap between parent and offspring, and (iii) as autocatalytic systems are competing for a common resource, there is both positive feedback (efficient reactions get faster and faster) and negative feedback (the efficient reactions deprive less efficient reactions of C1, making them run more slowly), which can lead to a range of phenomena including multistability and hysteresis/memory²³, (iv) this, the existence of multiple autocatalytic cycles and co-occurring reactions (as in the formose reaction system⁵, [Extended Data Fig. 1](#)), and the possibility for autocatalysis to emerge from simple reactions in compartments coupled through exchange⁵, may provide the means to implement sustained selectable hereditary variation²⁴. These factors may allow this kind of system access multiple chemical attractors and heritable states and ultimately to undergo natural selection and maybe even limited evolution.

4.2.6.ii. Supplementary References

- 1 Winkelman, J. G. M. & Beenackers, A. A. C. M. Correlations for the Density and Viscosity of Aqueous Formaldehyde Solutions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **39**, 557-562 (2000).
- 2 Rivlin, M., Eliav, U. & Navon, G. NMR Studies of the Equilibria and Reaction Rates in Aqueous Solutions of Formaldehyde. *J. Phys. Chem. B* **119**, 4479-4487 (2015).
- 3 Silk, E. A. Introduction to Spacecraft Thermal Design. (Cambridge University Press, 2020).
- 4 Ricardo, A. *et al.* 2-Hydroxymethylboronate as a Reagent To Detect Carbohydrates: Application to the Analysis of the Formose Reaction. *J. Org. Chem.* **71**, 9503-9505 (2006).
- 5 Blokhuis, A., Lacoste, D. & Nghe, P. Universal motifs and the diversity of autocatalytic systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **117**, 25230-25236 (2020).

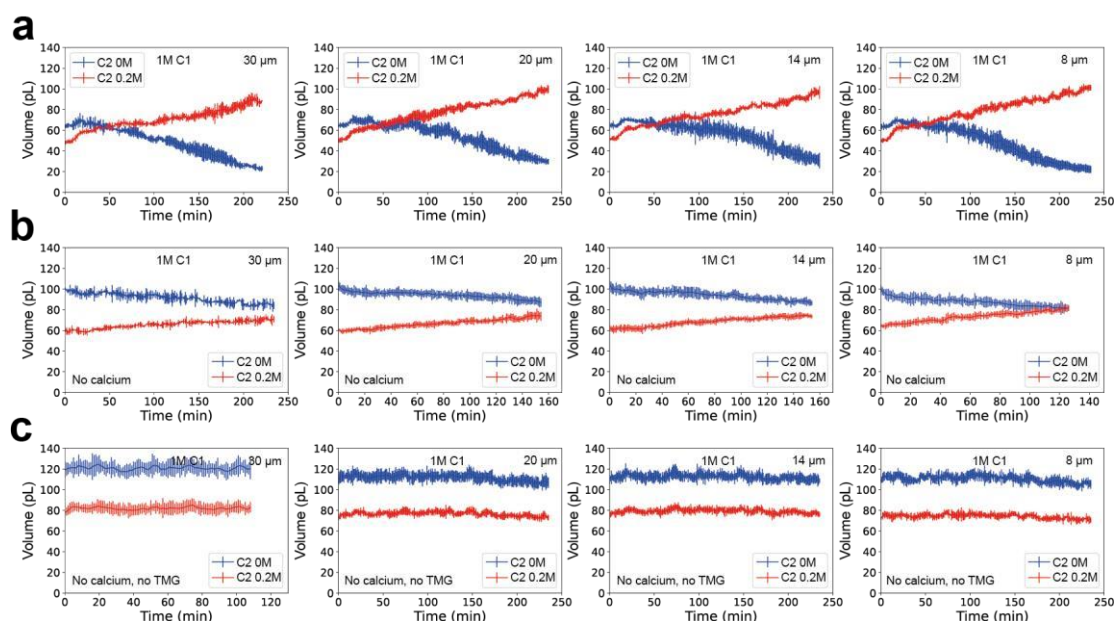
- 6 Breslow, R. On the mechanism of the formose reaction. *Tetrahedron Lett.* **21**, 22-26 (1959).
- 7 Socha, R. F., Weiss, A. H. & Sakharov, M. M. Homogeneously catalyzed condensation of formaldehyde to carbohydrates: VII. An overall formose reaction model. *J. Catal.* **67**, 207-217 (1981).
- 8 Joyce, G. F. & Szostak, J. W. Protocells and RNA Self-Replication. *CSH Persp. Biol.* **10**, a034801034822 (2018).
- 9 Mason, T. G. & Bibette, J. Shear Rupturing of Droplets in Complex Fluids. *Langmuir* **13**, 46004613 (1997).
- 10 Link, D. R., Anna, S. L., Weitz, D. A. & Stone, H. A. Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices. *Phys. Rev. Lett.* **92**, 054503 (2004).
- 11 Gánti, T. Organization of chemical reactions into dividing and metabolizing units: The chemotons. *Biosystems* **7**, 15-21 (1975).
- 12 Gánti, T. *The Principles of Life.* (Oxford University Press, Oxford, 2003).
- 13 Gánti, T. *The principles of life (in Hungarian).* (Gondolat, Hungary, 1971).
- 14 Szathmáry, E. *Nature* **433**, 469-470 (2005).
- 15 Gánti, T. *The principles of life (in Hungarian).* 2 edn, (Gondolat, Hungary, 1978).
- 16 Gánti, T. *Chemoton Theory Vol. 2. Theory of Living Systems. Vol. 2* (Kluwer/Plenum, New York, 2003).
- 17 Maynard Smith, J. & Szathmáry, E. *The major transitions in evolution.* (Oxford University Press, Oxford, 1995).
- 18 Gestel, J. v. & Tarnita, C. E. On the origin of biological construction, with a focus on multicellularity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 11018-11026 (2017).
- 19 Eigen, M. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Die Naturwissenschaften* **58**, 465-523 (1971).
- 20 Eigen, M. & Schuster, P. *The hypercycle: A principle of natural self-organization.* (SpringerVerlag, Berlin, 1979).
- 21 Czárán, T. & Szathmáry, E. in *The Geometry of Ecological Interactions: Simplifying Spatial Complexity* Cambridge Studies in Adaptive Dynamics (eds Johan A. J. Metz, Richard Law, & Ulf Dieckmann) 116-134 (Cambridge University Press, Cambridge, 2000).
- 22 Sommer, R. J. Phenotypic Plasticity: From Theory and Genetics to Current and Future Challenges. *Genetics* **215**, 1-13 (2020).
- 23 Angeli, D., Ferrell, J. E. & Sontag, E. D. Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 1822-1827 (2004).
- 24 Vasas, V., Fernando, C., Santos, M., Kauffman, S. & Szathmáry, E. Evolution before genes. *Biol. Direct* **7**, 1 (2012).

4.2.6.iii. Supplementary Figures



Supplementary Figure 1. Transport of solutes and solvent between droplets in 1D droplet arrays. Plots of droplet volume versus time from 1D droplet arrays in which alternating droplets contain a high concentration and low concentration of solute, for different inter-droplet distances (centre-to-centre separation of 40 μm , 30 μm , 20 μm , 14 μm and 8 μm). Solutes formaldehyde (C1), glycolaldehyde (C2), glyceraldehyde (C3), threose (C4), xylose (C5),

sucrose (C12) and methanol (MeOH) were analysed. The mean volume of all droplets with high concentration (red lines) and low concentration (blue lines) of solute $\square 1$ standard deviation (vertical lines) is shown. N/A, data not available. **a**, 0.8 M versus 0.8 M C1. **b**, 8M versus 0.8 M C1. **c**, 0.8 M versus 0.8 M C2. **d**, 8M versus 0.8 M C2. **e**, 0.8 M versus 0.8 M C3. **f**, 0.8 M versus 0.8 M C4. **g**, 0.8 M versus 0.8 M C5. **h**, 0.8 M versus 0.8 M C12. **i**, 0% versus 15% MeOH.



Supplementary Figure 2. Formose reaction in droplets in 1D droplet arrays. Plots of droplet volume versus time for alternating droplets containing formose reaction mixtures with 0.2M glycolaldehyde and no glycolaldehyde for different inter-droplet distances (centre-to-centre separation of 30 μm , 20 μm , 14 μm and 8 μm). The mean volume of all droplets with 0.2 M glycolaldehyde (C2 0.2M, red lines) and 0 M glycolaldehyde (C2 0M, blue lines) $\square 1$ standard deviation (vertical lines) is shown. All reactions were incubated at 40°C. **a**, Droplets containing standard formose reagents (1 M formaldehyde, C1 1M). **b**, Droplets containing standard formose reagents (C1 1M), but without CaCl_2 (No calcium). **c**, Droplets containing the standard formose reagents (C1 1M), but without CaCl_2 and without TMG (No calcium, no TMG).

4.2.6.iv. Supplementary Movies

(to be provided with the upcoming publication)

Supplementary Movie 1. Formation of alternating droplets of different size and composition.

Supplementary Movie 2. The hydrodynamic switch for on-demand droplet loading.

Supplementary Movie 3. Droplet buffering in a 1D droplet array.

Supplementary Movie 4. A one-dimensional (1D) array of aqueous droplets containing standard formose reagents (1 M formaldehyde (C1), 0.02 M CaCl₂ and 1M TMG) during a 4 h incubation at 40°C. The ~100 pL droplets initially contained 1 M formaldehyde (C1), 0.02 M CaCl₂ and 1M of TMG while the ~60 pL droplets contained, in addition, 0.2 M glycolaldehyde (C2).

Supplementary Movie 5. A two-dimensional (2D) array of 778 pL aqueous droplets containing standard formose reagents (1 M formaldehyde (C1), 0.02 M CaCl₂ and 1M TMG) during a 1 h incubation at 40°C. Two populations of droplets were mixed in a 1:1 ratio: droplets additionally containing 0.2 M glycolaldehyde (0.2 M C2, unlabelled) or no glycolaldehyde (no C2, labelled with green silica nanoparticles).

Supplementary Movie 6. A two-dimensional (2D) array of 81 pL aqueous droplets containing standard formose reagents (1 M formaldehyde (C1), 0.02 M CaCl₂ and 1M TMG) during a 1 h incubation at 40°C. Three populations of droplets were mixed in a 2:1:1 ratio: droplets with no C2, and additionally containing 0.2 M glycolaldehyde (0.2 M C2, labelled with green silica nanoparticles) or 0.05 M glycolaldehyde (0.05 M C2, labelled with red silica nanoparticles).

Supplementary Movie 7. Single size-dependent droplets division in a microfluidic device. Droplets over a threshold volume, $v_d \geq 400$ pL were divided symmetrically at the T-junction.

Supplementary Movie 8. Double size-dependent droplets division in a microfluidic device. Droplets over a threshold volume $v_d \geq 400$ pL and ≥ 200 pL, respectively, were divided symmetrically at the first and second T-junctions.

Supplementary Movie 9. A two-dimensional (2D) array of 71 pL aqueous droplets containing formose reaction reagents (1 M formaldehyde (C1), 0.02 M CaCl₂ and 1M TMG) during a 1 h incubation at 40°C. Droplets containing no C2 (labelled with red silica nanoparticles) and containing 0.2 M C2 droplets (unlabelled) were mixed in a 2:1 ratio.

Supplementary Movie 10. A two-dimensional (2D) array of aqueous droplets containing formose reaction reagents (1 M formaldehyde (C1), 0.02 M CaCl₂ and 1M TMG) during a 1 h

incubation at 40°C. After single size-dependent droplet division, droplets from the experiment shown in [Supplementary Movie 9](#) were mixed with a 2-fold excess of freshly prepared 140 pL no C2 droplets (labelled with green silica nanoparticles).

4.2.6.v. Supplementary Files

(to be provided with the upcoming publication)

Supplementary File 1. CAD file of device to produce monodisperse droplets with a defined composition.

Supplementary File 2. CAD file of device to produce alternating droplets of different volume and composition and incubate these droplets in 1D arrays.

Supplementary File 3. CAD file of device to incubate droplets in 2D arrays.

Supplementary File 4. Adobe Illustrator file of device to incubate droplets in 2D arrays (to directly program the cutting plotter).

Supplementary File 5. CAD file of device to perform a single size-dependent droplet division.

Supplementary File 6. CAD file of device to perform a double size-dependent droplet division.

Supplementary File 7. Annotated code for the toy model. The code is available as a Jupyter bundle programmed with IPython 7.19.0 based on Python 3.8.5.

5. The origins of life in RNA catalytic networks

This chapter highlights, for an informed audience in biochemistry, how to bring out evolutionary dynamics within chemical reaction networks, with a specific focus on the use of RNA. In a first step (part 5.1), we present a state of the art of theoretical and experimental results of evolutionary dynamics implemented through reaction networks. We show how different strategies have been implemented on the basis of different dynamics (e.g., templatebased replication or autocatalytic collective sets), or on the basis of different molecules (e.g., proteins or RNA). Here, we explain which strategies are possible to implement biological concepts (such as heredity) in physicochemical systems. Furthermore, we highlight the interest of the group I intron RNA family to implement a variety of evolutionary dynamics. In a second step (part 5.2), we present experimental results that we have carried out and supported by a mathematical model. We have used the abilities of the *Azoarcus* group I intron ribozyme to implement in an RNA system diversification and reproduction dynamics, necessary for a Darwinian evolution.

Part 5.1 is adapted from:

Ameta, S., Blokhuis, A., Jeancolas, C. and Nghe, P. “Toward evolution chemical reaction networks”, in *Prebiotic Chemistry and Life's Origin*, dir. Fiore, M., The Royal Society of Chemistry Press, London, in press and from:

Lambert, C., Jeancolas, C., Vybornyi, M., Sandeep, A. and Nghe, P. “Toward synthetic RNA evolution using engineered group I introns” (in preparation, order of the authors to be determined).

Part 5.2 is adapted from:

C. Jeancolas, Y. J. Matsubara, M. Vybornyi, C. N. Lambert, A. Blokhuis, T. Alline, A. D. Griffiths, S. Ameta, S. Krishna and P. Nghe, ‘RNA diversification by a self-reproducing ribozyme revealed by deep sequencing and kinetic modelling’, 2021, *Chem. Commun.*, 2021, DOI:10.1039/d1cc02290c.

5.1. Strategies to bring about evolution in chemical reactions networks

Chemical reaction networks are central to abiogenesis, from the synthesis of chemical building blocks to the appearance of genetic systems and protocells. Evolutionary mechanisms provide means by which complexity and functionality can build up during the origin of life. However, building a physical-chemical system that can evolve has not yet been achieved. In this chapter, we review experimental efforts and corresponding theories toward building and discovering evolutionary properties in chemical reaction networks. Experimental systems range from small molecules to RNA, DNA, and peptides. Theory indicates that evolution could have started without mechanisms based on genetic polymers. Research on genetic polymers indicates that template-based replication may have been preceded by autocatalytic networks. We particularly review the promise of using a specific class of catalytic RNAs, the group I intron. Because of their ability to catalyze chemical reactions and to store information, RNA systems are of great interest to bring about evolutionary dynamics. A systems level approach can reveal generic principles for achieving and assembling evolutionary properties in physical-chemical systems and may ultimately indicate a multiplicity gradual paths for the emergence of evolution.

5.1.1. Introduction

Addressing the question of the origin of life can be thought of discovering paths from physicochemical processes to biological properties. Physics and chemistry study diffusion, selfassembly, phase transitions, thermodynamics, reactions, catalysis, whereas biology studies metabolism, growth, evolution, homeostasis, adaptation, development. Therefore, central to origin of life studies is the notion of emergence,¹ understood here as biological properties being implemented from physical and chemical properties. Part of the answer thus lies in considering not only ‘spontaneous emergence’, where biological-like properties appear from a prebiotically plausible complex mixture as in Miller’s experiment,² but also ‘synthetic emergence’, where biological-like properties are designed and experimentally constructed from non-living components.³

This chapter summarizes recent efforts to theoretically and experimentally implement evolution in chemical reaction networks. Evolution is a key process that differentiates chemical and biological systems, and it should be understood here as Darwinian evolution, i.e. the combination of variation, reproduction with heredity and selection.⁴ Chemical reaction networks are relevant to all stages of origin of life scenarios, from small molecule autocatalysis, to autocatalytic sets, the first genetic systems, and extent cells. We do not adopt the traditional distinction between ‘metabolic first’ and ‘genetic first’ scenarios because these terms do not reflect the recent conceptual and experimental discoveries. Indeed, on one hand, as we will discuss, it is becoming conceivable that evolution may have started before the appearance of genetics based on the replication of nucleic acid templates, as early as from small molecule autocatalysis. On the other hand, attempts to build an RNA replicase ribozyme catalyzing the replication of its own sequence have led to consider the replicase activity as part of a broader autocatalytic network comprising multiple types of catalysts.⁵

To illustrate the challenge of synthetic emergence in origin of life, let us consider the problem of translating the evolutionary notion of a ‘diversity of heritable states’ in physico-chemical terms.⁶ This notion is central to Darwinian evolution given that natural selection relies on competition between entities of different types. A heritable state is not merely an out-of-equilibrium state that sustains in time, and in this sense, it should not be confused with homeostasis, robustness or integrity. Heredity is defined in the context of entities that reproduce, where newly produced entities share characteristics of those from which they originate. For this to be possible, differences in the state of new entities must be conditional on similar differences in the state of pre-existing ones. Such conditionality discards linear chains of chemical reactions which tend to produce chemicals that remain similar over time. Although the output of the latter chemistry may appear indistinguishable from the output of a system that reproduces with heredity (chemicals are produced continuously, can accumulate, and are similar to each other), the nature of the products does not causally depend on former products but only depends on upstream reactants. In other words, for heredity, there must be a feedback between the reaction output at a certain time and a later output. A chemical version of such feedback is autocatalysis, meaning that among the products of a set of chemical reactions, some of them catalyze reactions of the set.

So far, we have described how self-reproduction can be implemented chemically as autocatalysis. The conditionality of autocatalytic reactions on their products confers a mean by which variation in the output may be sustained. However, how such variation can be maintained in a stable manner remains to be specified. Stability is expressed in the space of chemical compositions, defined as the fraction of the different molecular species. In a growing system, chemical composition is obtained by normalizing the amount of each species by the total amount of species. To obtain a diversity of heritable states, one needs autocatalytic reaction networks whose kinetics lead to multiple stable states (attractors) in the space of chemical composition (Figure 1).

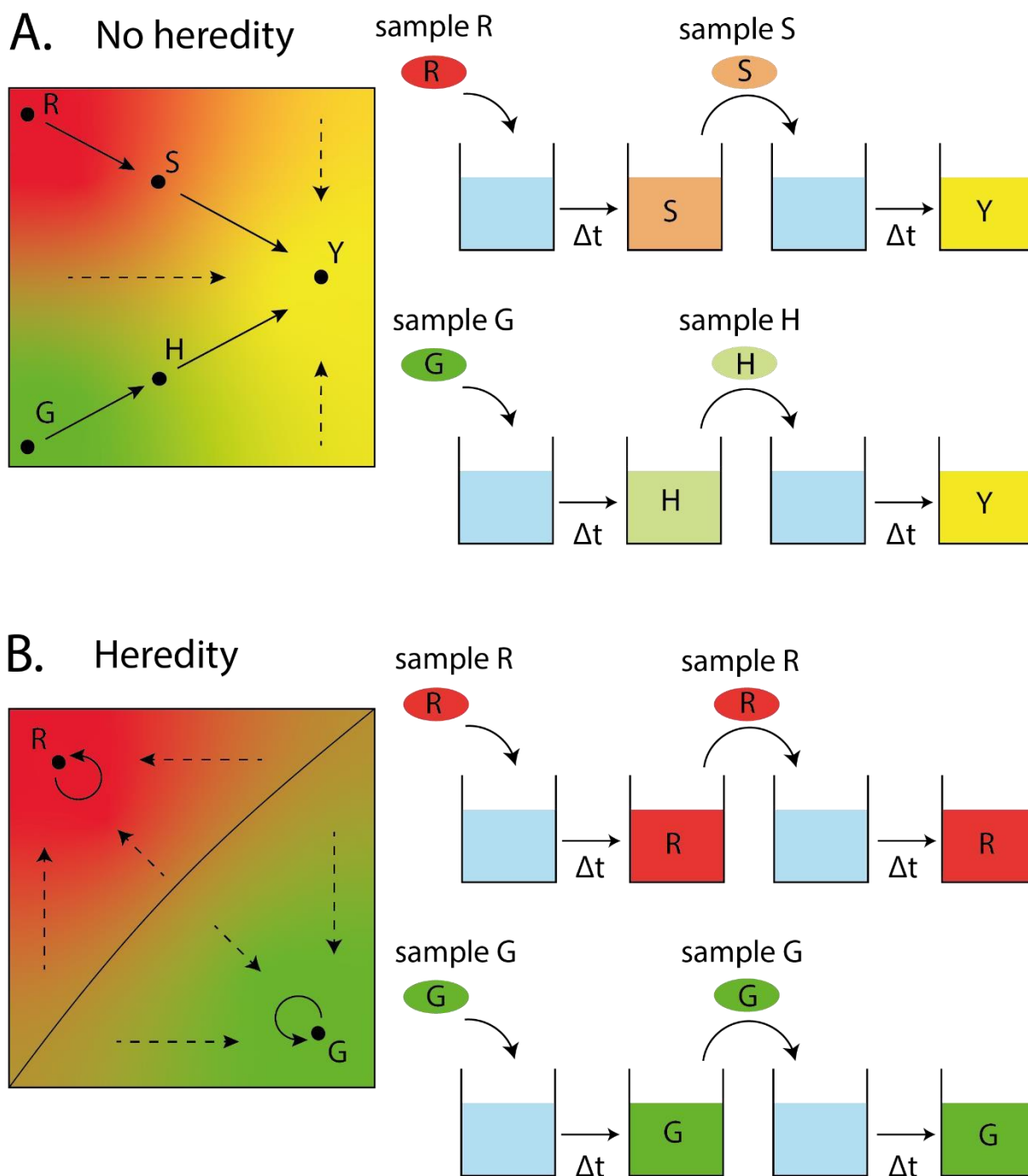


Figure 1. Phenomenology of heredity in the space of chemical compositions and corresponding serial dilution experiments. A. No heredity. Solutions R and G have different chemical compositions, thus there are at different places in the space of chemical composition schematized by the square on the left. Along the transfers in the new vessels, that have the same initial compositions, the chemical compositions tend to a single attractor Y of a different chemical composition. **B. Heredity.** Along the transfers in the new vessels, solution R and G maintain their chemical compositions.

The above exercise comes down to translate a notion of evolutionary biology, namely the diversity of heritable states, into concepts closer to chemistry and physics, namely autocatalysis and a multistable dynamical system. We may then design and test reaction schemes implementing autocatalysis with multiple compositional attractors. However, this has not been

achieved yet. Furthermore, heredity (in the most general sense, including e.g. genetic but also compositional heredity) is only one property of evolution and other properties, such as variation and selection, need to be implemented and combined.

Before outlining the chapter, we clarify two points important for our purpose. First, we emphasize that synthetic experimental systems have a central role to play in the study the origin of life, complementary to experiments testing spontaneous emergence (e.g. Miller's experiment),^{2,7,8} even when the chemical conditions are not prebiotically plausible (i.e. independently of hypothesis on the temperature, salinity, or chemical building blocks present on Hadean Earth). Indeed, synthetic systems guide the identification of valid approximations and relevant parameters for theory, can provide conclusive evidence for the existence of dynamical regimes, and test the limits of these regimes.⁹ In particular, we still do not know any artificial chemical system that can evolve in a Darwinian way. Therefore, constructing any such artificial evolving system would be informative. Second, autocatalytic networks can in principle evolve in a Darwinian manner, even in the absence of template-based replication, which is the processive copying of sequences by base-pair complementarity. Indeed, limits to evolvability of autocatalytic networks have only been shown for a specific model, the GARD model, and only for specific implementations of it.¹⁰ Evolution has been shown theoretically possible with other implementations of autocatalytic networks, although we are only starting to uncover possible mechanisms.¹¹ Furthermore, evolution based on autocatalytic networks should not be discarded on the basis of template-based replication providing an a priori much higher evolvability. Indeed, life may have started with a rudimentary form of evolution.

In Section 5.1.2, we review experimental implementation of autocatalytic systems that use template-based ligation or replication, a strategy which has been applied to DNA, RNA as well as peptides, and discuss the current limitations of these systems. In Section 5.1.3, we introduce autocatalytic sets, their theory, experimental implementation, and possible routes toward their evolution. In Section 5.1.4, we focus on the development of engineered group I intron to bring about template-directed replication and non-templated replication in RNA only systems. At last, in Section 5.1.5, we review current effort to discover spontaneously emergent evolving reaction networks in complex out-of-equilibrium mixtures. Finally, we conclude by highlighting progress and challenges on the path to implement evolution in physico-chemical systems.

5.1.2. Evolution via template-based replication

Template-based replication by ligation

DNA-based system

Autocatalytic chemistry based on the template-based ligation of nucleic acids was the first experimental realization of a self-reproducing chemical system. In the pioneering work from von Kiedrowski,¹² a hexadeoxynucleotide was shown to self-reproduce via a chemical ligation reaction (using carbodiimide as a chemical activating agent) following a simple self-copying scheme: $A + B + T \rightarrow 2T$ where A, B are substrates and T is the template (see Figure 2). These are palindromic sequences such that upon reaction two copies of T are generated. Here two trinucleotide substrates were used which upon reaction results in either phosphodiester¹² or phosphoamidate¹³ linkage at the ligation site, generating a complementary copy of the template (Figure 2 A). These phosphoamidate linkages were found to increase the product formation in presence of phosphodiester containing templates and also help in distinguishing the product of the reaction (containing phosphoamidate linkage) from the starting template molecules (containing phosphodiester linkage). For the kinetic characterization of the process, an empirical equation was developed [$d(T)/dt = k_a(T)^p + k_b$] that accounts for the product formation via both autocatalytic and non-autocatalytic reaction pathways (Figure 2 B).^{12,14}

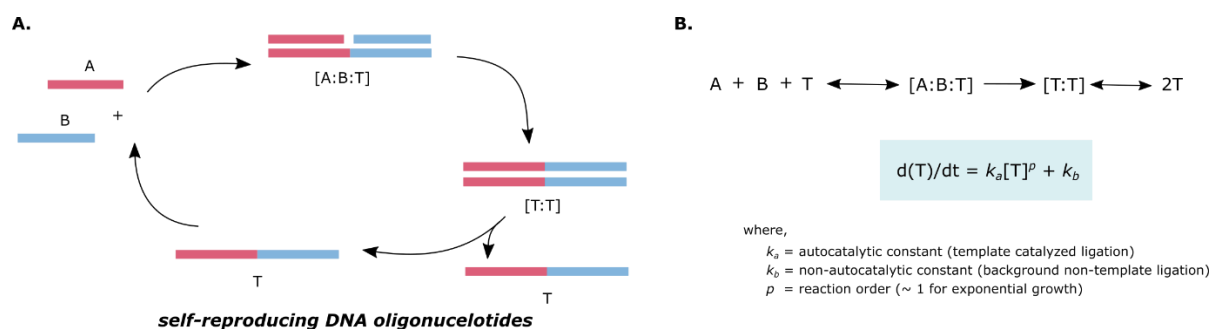
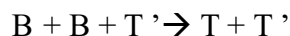
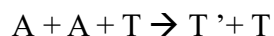


Figure 2. Self-reproducing nucleic acids. **A.** Schematic showing the self-reproduction using templated-ligation of DNA oligonucleotides¹² where terminally activated substrates (A, B) are ligated over the template (T). These are palindromic sequences, therefore it yields two copies of T when reacted. **B.** Empirical relationship which quantifies the product formation using both autocatalytic and non-autocatalytic pathways in a self-reproducing chemical system.¹⁴

Though exponential in theory, the rate dependence of the formation of the product on template was found to be sublinear due to poor release of newly synthesized template from T·T complex. To overcome this, Luther *et al.* devised a surface-promoted amplification strategy where the template was bound to solid support such that after templated ligation newly formed products can be washed away, regenerating it for the next round of ligation.¹⁵ Unlike other studies^{16–18} where molecular properties of fragments were modified to reduce the stability of the producttemplate complex (thus overcoming the product inhibition), here exponential amplification involve energy input from physical processes. While the example above shows self-loops, cross-catalytic networks were also constructed using this system wherein a two-membered network catalytic species helped each other synthesis (Figure 3). Here instead of acting as a template for self-reproduction, the product acts as a template for other complementary substrates using the reaction equations:



where $T = BB$, $T' = AA$. To achieve this, Sievers *et al.* used two trinucleotide substrates (e.g. A, B) and hexadeoxynucleotide sequences as a template to show cross-catalytic reproduction of AA and BB species. Apart from the cross-catalysis, self-reproduction of AB and BA species was also shown. When in the same pot, both cross- as well as self-catalysis was found to be equally efficient even though in isolation AA or BB species alone were much faster.¹⁵

Just after Von Kiedrowski work, Orgel *et al.* also showed self-reproduction of phosphoamidate tetra-deoxynucleotide using dimer substrates.¹⁹ The main difference compared to earlier work is here a complete phosphoamidate linkage containing template was used instead of natural phosphodiester ones due to which a much enhanced autocatalytic efficiency ($\mathcal{E} = k_a/k_b$) was observed. In a similar manner to DNA, a self-reproducing system based on PNA (peptidenucleic acids) was also developed using the same chemistry where two trimer PNAs were used to demonstrate self-reproduction of a hexameric PNA.²⁰

Even though self- and cross-catalytic reproduction of nucleic acids was demonstrated by templated ligation of short DNA strands, these systems have not been shown to create a diversity of networks. Such diversity would be required to carrying out evolution using DNA-based self-reproducing systems.

RNA-based template ligation

The templated ligation based self-reproducing system using RNA has also been developed following the same $A + B + T \rightarrow 2T$ strategy. However, unlike the DNA-based systems where template does not play any catalytic role, in this case RNA also acts as a catalytic entity (ligase ribozyme) apart from providing template.²¹ Here *in vitro* selected ligase ribozyme ('R3C' ligase)^{22,23} was engineered by making a symmetrical dimer in which the ribozyme was fragmented into two identical halves where one-half act as a template to ligate fragments of other half to generate a copy of the ribozyme (Figure 3).²¹

Similar to DNA-based system, ribozyme synthesis from substrate fragments was found linearly depend on the amount starting RNA template.¹⁴ The formation of the non-productive ternary complex ($A \cdot B \cdot A \cdot B$) is far less compared to the DNA system which resulted in much lower k_b . Using the same strategy as DNA template ligations, the RNA system was also engineered to form a cross-catalytic two-membered network where two complementary binding ribozymes catalyze each other's synthesis²⁴ (Figure 3). The system was also exploited to experimentally demonstrate the emergence of faster reproducers from a pool of substrates.¹⁶ Here starting from 48 substrates comprising 12 pairs of cross-replicating ligase ribozymes, a serial-transfer experiment was performed by transferring 5% of the reaction material to a fresh tube of

substrates each 5 hours. After 20 such transfers, different emerging genotypes containing self, cross-, and new recombinant reproducers were observed. Surprisingly, a recombinant product appeared to be the fastest replicator even though it is a very poor reproducer in isolation. The emergence of such fast recombinant reproducer over self-catalyzing species when all the substrates are present indicates that there is a well-connected underlying network where many links contribute to the growth of such species. Also, as the authors pointed, such recombinants could be relatively more resistant to the inhibition by other substrates in the mixture leading to their enrichment in the final pool.

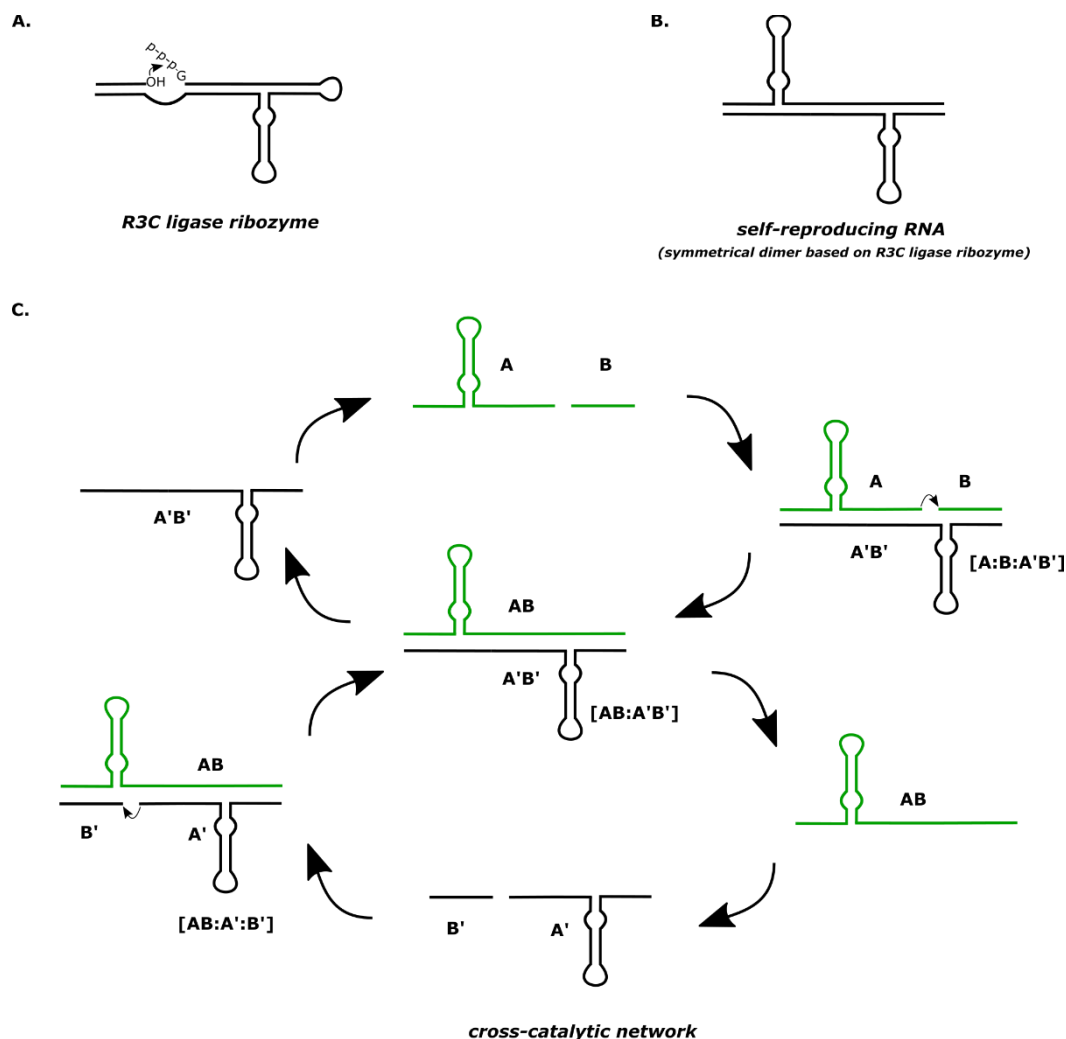


Figure 3. Ligase ribozyme-based self-reproducing RNA system. A-B. Schematic of the secondary structure of the R3C ligase ribozyme (A)²² which was systematically converted into symmetrical dimer to develop a self-reproducing RNA system (B).²¹ C. Cross-catalytic reaction network created using modified R3C ligase ribozyme. Here AA and A'B' cross-catalytically reproduce each other using A, B, A', B' RNA fragments as substrates.²⁴

Template-based ligation of peptides

Peptides were also exploited to construct self-reproducing chemical systems owing to their ability to form secondary structures, like α -helices, which allow two peptide strands to bind to each other in a similar way as nucleic acids. Using a 32-amino acid long coiled-coil α -helix (containing 'heptad' repeats) derived from a yeast transcription factor ('GCN4'), a template-based self-reproducing peptide system was developed where two chemically activated fragments of the coiled-coil helix are wrapped around the peptide template and ligated.²⁵ The peptide fragments were modified at ends with thiobenzyl ester (E, electrophile) and cysteine (N, nucleophile) to facilitate the joining via thioester-mediated native chemical ligation²⁶ (Figure 4). In the same way as DNA-based systems, here autocatalytic feedback was established by titrating different amounts of templates over the ligation of fragments. As expected in the template-based system, the ligation reaction was found to depend on the square root of template concentration due to product inhibition. Later on, this system was also modified to construct a cross-catalytic cycle where two peptide-reproducer were shown to help each other's synthesis using one common, and one specific peptide fragments²⁷ (Figure 4). The cross-catalytic potential of the system was further interrogated *in silico* by designing peptide sequences in order to predict potential self-, and cross-catalytic nodes.²⁸ The diversity in the sequences was achieved by varying interacting residues in coiled-coil α -helix and potential catalysts were predicted based on the stabilities of substrate-template complexes. Starting with 81 peptide sequences they predicted 25 nodes connected by 53 catalytic links several of which were also experimentally verified.

Later on, Ashkenasy's group introduced reversible trans-thioesterification chemistry in peptide system.^{29,30} Here, one of the substrates was modified to contain a thiol group such that a reversible thioester bond can be formed which is susceptible to free thiols. The reversibility of the ligated product was found to be well correlated with the stability of the substrate-template complex and therefore stable complexes resulted in efficient catalysis. Since there is a net difference between forward and reverse reaction rates ($E + N + T \leftrightarrow 2T$, see Figure 4), the system was further exploited to experimentally demonstrate bistability in self-reproducing peptides.³¹ Here, starting with substrates E and N, thiol reaction reaches a different state (high E, N and low T; low steady-state) compared to when started with T and thiol (low E, N and high T; high steady state) (Figure 4). This bistability can be made long-lived by coupling the system to a redox cycle that uses TCEP (tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride which reduces disulfides to thiols.³² Furthermore, using the same system multi-stability was also explored theoretically by coupling two replication cycles, each capable of bistability.³³

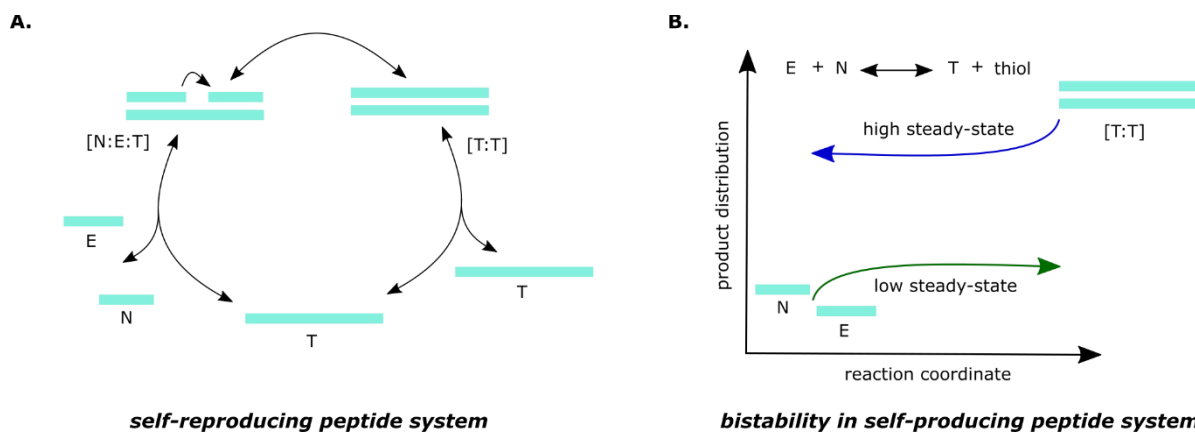


Figure 4. Self-reproducing peptide system. **A.** Template-based self-reproducing peptide derived from coiled-coil helices.²⁵ Here, 32 residue long peptide (T) self-reproduce by templating modified electrophilic and nucleophilic substrates (E, N). **B.** Scheme showing the bistability in the self-reproducing peptide system. Here when reaction is started with high concentration of substrates (E, N) and low concentration of T, it reaches low-steady state. Whereas when reaction started with high concentration of T in presence of thiol it reaches high steady state (distribution of E, N, T) where thiol makes this reaction reversible.³²

Apart from the α -helix architecture above, another template-based self-reproducing peptide system was also developed which is derived from coiled-coil architecture of tropomyosin protein.^{34,35} In addition to self-reproduction, here the interacting residues of the peptides were modified such that the assembly of peptides could be controlled by the environment (pH or ionic strength).^{35,36}

Templated-based replication by polymerisation

Catalyzed template-based replication

Template-based polymerases, or replicases, are an essential ingredient of Darwinian evolution in extant biology. DNA-dependent DNA polymerases are enzymes responsible for the doubling of genetic information along with the incorporation of mutations, thus allowing multiplication with heredity and variation. The early emergence of replicases is often believed to have kickstarted Darwinian evolution in the origin of life. However, their error rate and the length of the copied polymers are subjected to strong constraints gathered around the concept of the “error threshold” initially forged by Eigen in 1971.³⁷ A polymer’s sequence is sustained through replication cycles only if there is no replication error, or if it is selected against erroneous copies. The latter case involves a selective advantage of the reference sequence that can be formulated as the ratio of its replication rate to that of the erroneous sequences. For a selected reference sequence of a given length to be sustained, the replicase must display an error rate below a specific value: the error-threshold. Above it, the selective advantage becomes insufficient and the reference sequence vanishes in a pool of erroneous copies: it is the error catastrophe. The

same event occurs if the reference sequence exceeds a specific length when being replicated at a given error rate.

RNA-dependent RNA polymerases, such as the viral Q β -replicase, are other instances of natural protein replicases. They are used to empirically emulate Darwinian evolution and host– parasite oscillation dynamics in systems of replicated RNA.^{38,39} With the discovery of catalytic RNA, it became possible to consider RNA-based replicases and thus template-based replication in RNA only systems.⁴⁰ However, for such a system to grow, the replicase must replicate its own sequence as well as others, thus being a self-replicase. This further consideration drastically lowers the error threshold⁴¹ reducing the number of theoretical replicases.⁹ Nonetheless, other considerations show how the threshold can be revised upwards. For instance theoretical and empirical studies have shown that introducing a dynamic of selected compartments^{42–44} or taking into account neutral mutations⁴⁵ increase significantly the maximally tolerable error rate.

Initial attempts to create RNA-based polymerases (replicases) involved self-splicing ribozymes where transesterification reaction of group I introns was exploited to ligate either single nucleotides (using dinucleotides as substrates)⁴⁶ or oligonucleotide fragments^{47,48} over a template. We will develop this particular chemistry in Section 5.1.4. Then later, ligase ribozymes isolated from directed selection protocols⁴⁹ were developed in RNA polymerases that can thrive on NTPs (nucleoside triphosphate). While the wild-type ligase itself⁵⁰ was able to polymerize up to 6 nucleotides using a specific template, improved polymerases were obtained (by rational design and directed selections) which can add up to 14 nucleotides with high fidelity, and over different templates.⁵¹ The structure analysis of this general RNA polymerase revealed striking catalytic mechanism similarities with protein polymerase enzymes.⁵² To improve the ability to copy longer templates, Wochner *et al.* developed a compartmentalized bead tagging strategy (using water-in-oil emulsions) where ligase-derived polymerases⁵¹ were subjected to *in vitro* evolution and RNA engineering resulting in an improved polymerase which could copy up to 95 nucleotides.⁵³ Though this polymerase used a repeated stretch of 11 nucleotides as a template to achieve longer copying, but still was able to faithfully copy a functional version of a minimized hammer-head ribozyme (around 24 nucleotides) as a proof-of-principle. Same polymerases⁵¹ were subjected to *in vitro* evolution strategy which enriches active catalysts in the eutectic phase (crowded environment formed at low temperatures by aqueous solution containing ions including RNAs).⁵⁴ This allowed to select ice-active polymerase which found to be catalyzing polymerization reaction at -7°C (even at -19°C), however, the best efficiency and fidelity was found to be at 17°C (the temperature at which parent ribozyme was also efficient). The evolved version was capable of copying around 206 nucleotides (more than of its own length of 202 nucleotides) but still used repeating 11 nucleotides stretch as a template. This limited the replication ability of RNA polymerase as the templates were not diverse and were usually cytidine-rich. In order to increase its efficiency on diverse and more complex templates (structured), different strategies were developed over the last years. One of them was a functional selection strategy where copying of structured aptamers were used instead for polymerization of NTPs on the non-structured templates. This resulted in polymerases that were capable of copying aptamers, tRNA, and ribozymes.⁵⁵ Copying a structured template was also found to be easier when nucleotide triplets (trinucleotide triphosphates), instead of mononucleotides, were used as substrates to evolve RNAs by directed

evolution.⁵⁶ Surprisingly, this study also resulted in the spontaneous emergence of cooperative polymerases that act as ‘heterodimers’ to catalyze the polymerization reaction using ‘triplets’ substrate without involving primers. Recently, these polymerases were subjected to directed evolution resulting in versions which can copy even fragments of its own ‘ancestor’, ‘class I ligase’, though with very reduced efficiency and fidelity.⁵⁷

In one of the studies, the emergence of such ligase-derived polymerases has also been shown via a network approach where shorter fragments (around 30 nucleotides) of the polymerase⁵³ assemble using the trans-esterification activity (ligation and cleavage) of hammer-head ribozyme with the help of freeze-thaw cycles.⁵ The reaction mixture containing fully assembled products and non-ligated substrate fragments was also found to be able to catalyze polymerization reaction (primer extension) on shorter templates.

Uncatalyzed template-based replication

A possible scenario is that non-enzymatic template copying of RNA may have started evolution, leading to the later appearance of much more efficient and complex template-based polymerase ribozymes. Non-enzymatic polymerization involves the incorporation of activated monomers of RNA where a primer strand is extended in a templated manner⁵⁸ (Figure 5). In most of the cases, imidazolide-based activation chemistry is used where the 3’OH end of the primer (or previously added nucleotide) attacks the phosphate group (activated by imidazolide) to form a phosphodiester bond.^{58,59} Thorough mechanistic analysis revealed that these imidazolide-activated nucleotides form a 2-aminoimidazolium bridge intermediate between two nucleotides and, this dimer instead of imidazolide-activated monomers acts as a substrate for the extension.⁶⁰

Another important characteristic which a replication system must have is unbiased incorporation of all four NTPs. While initial studies on non-enzymatic polymerization showed that incorporation of G and C is far more efficient (especially G over C-rich templates) than A or U later on,⁶¹ strategies were developed to have uniform addition of nucleotides. Deck *et al.* showed that using a surface-immobilized template, and employing a washing step in the incorporation protocol can help in incorporating all four bases.⁶² Here, small oligomers that bind downstream of incorporating nucleotide act as catalysts (‘microhelpers’). Such effect was also observed earlier where it was proposed that binding of downstream monomers have a catalytic effect on the nucleotide incorporation. Prywes *et al.* then systematically studied this effect and found out that the binding of 5’-activated oligos downstream has maximum effect on the incorporation.⁶³ They have further used this strategy to copy a fragment of hammer-head ribozyme to demonstrate the potential of non-enzymatic template polymerization in generating functional molecules. Even though tremendous efforts have been put into increasing the efficiency, fidelity, and understanding the mechanism of incorporation, non-enzymatic RNA polymerization is still not capable of copying longer sequences (the maximum is around 12 nucleotides)⁶³ which could be a limitation in generating complex functional RNAs. However, such chemistries must have preceded ribozyme-based polymerization to generate substrate fragments through which complex RNA catalysts can be assembled. To synthesize longer sequences, in a recent work Zhou *et al.* reported a strategy where using 5’-imidazolide-activated

tetramer RNA substrate longer oligonucleotides can be synthesized employing a splinted template (Figure 5 B).⁶⁴

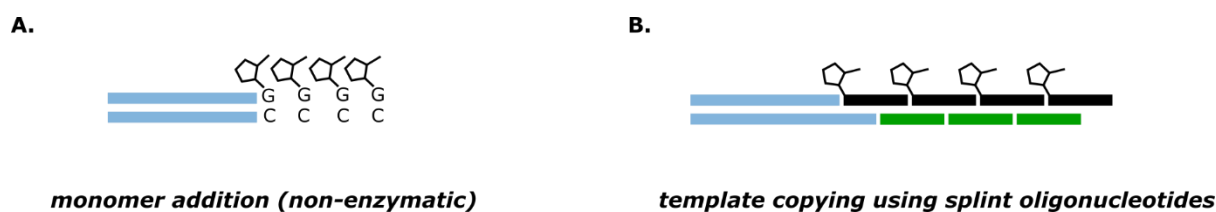


Figure 5. Non-enzymatic copying of oligonucleotides. A. Schematic representation of nonenzymatic addition of imidazolide activated monomers (G nucleotide) over the template.^{58,59} B. Longer length sequences can be synthesized using same activated chemistry by employing imidazolide-modified tetramers (black) on a template of tetramer splint oligomers (green).^{58,64}

5.1.3. Autocatalytic sets, theories and experiments

5.1.3.i. Autocatalytic set theory

In this subsection, we overview the theory of Autocatalytic Sets (ACS), from their definition to their potential for Darwinian evolution. ACSs are a particular category of autocatalytic networks.⁶⁵ Indeed, ACSs must admit a description where every reaction stage is catalyzed by a single molecular species (Figure 6). Such description is coarse-grained where the catalytic cycles of the reaction network are represented as a bipartite graph comprising two types of nodes (for catalyzed species and for catalysts) and edges (for reaction and for catalysis). This representation omits elementary reaction steps and is meaningful only if they are non-limiting. In an ACS, autocatalysis may arise when every catalyst of the reaction set is the product of one of the reactions of the set.⁶⁶ This property is not sufficient however, because the network also needs to be kinetically viable and notably overcome degradation and dilution.⁶⁷ Because every catalyst in an ACS is also a reaction product, it is most common to consider ACSs in the context of biopolymers such as RNA and peptides, given that these polymers can fold as catalyst of reactions using polymer substrates of the same nature: RNAs catalyze RNA reactions, peptides catalyze peptide reactions. It is also worth mentioning here that ACSs are completely different from, but often confused with, hypercycles. Despite similarities in their graph representation, hypercycles assume every species to be a polymer copied by template-based replication⁶⁸ whereas ACSs do not require template-based replication. This distinction is crucial for origin of life scenarios because ACSs rely on catalysts simpler than polymerases and they could have preceded template-based replication.⁶⁹

The notion of ACS became significant when Kauffman showed theoretically that the spontaneous formation of an ACS is plausible in a model of peptide reactions.⁶⁶ The fundamental idea is to demonstrate that, in a chemistry comprising long enough peptides, the

appearance of an ACS is highly probable. This model considers all possible sequences up to a certain length L , all possible reactions of fragmentation (cleavage) or condensation (ligation) of the peptides, and assigns a unique and uniform probability P for every peptide species to catalyze any given reaction. In such chemistry, the presence of an ACS is guaranteed if one finds a ‘catalytic closure’, which is equivalent to finding a cycle of species where every species catalyzes the formation of the next. More generally, one considers here the graph where an edge points from a species A to a species B if and only if A catalyzes the formation of B . A result of graph theory states that the probability to find a cycle tends to 1 in the limit of large random graphs when the ratio R between the number of edges (reactions) and vertices (species) exceeds $1/2$.⁷⁰ Given the definition of P , it was shown that R increases at least linearly with the maximum polymer length.⁶⁶ Consequently, R necessarily exceeds the catalytic closure threshold when polymer length L is large enough, implying the existence of an ACS.

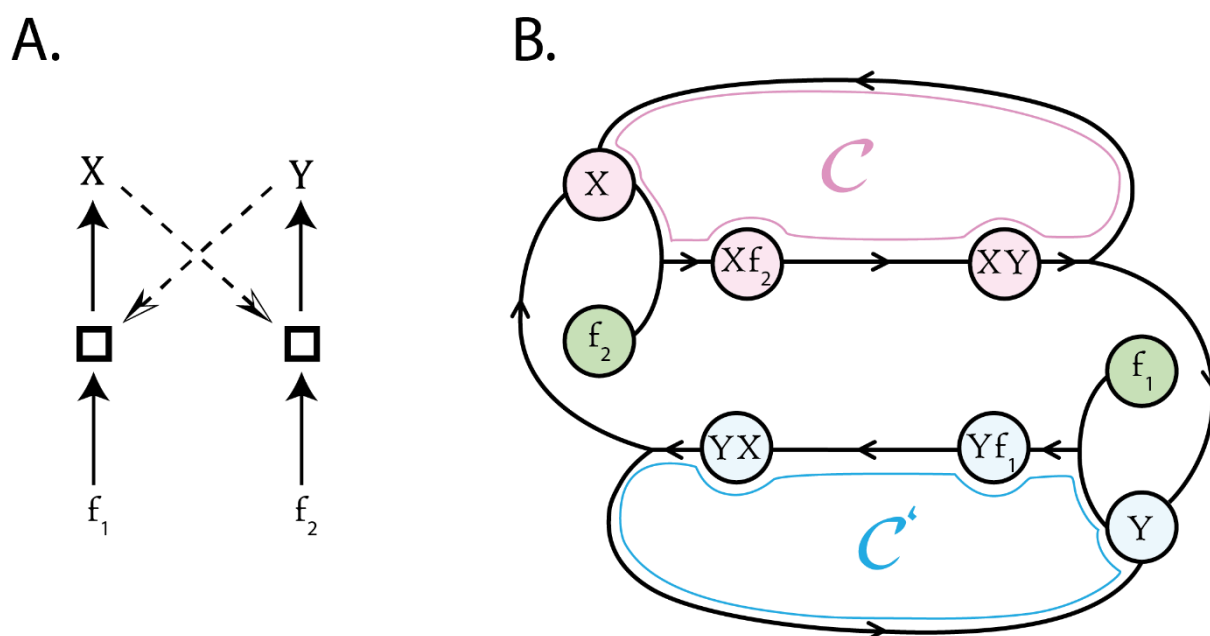


Figure 6. Different representations of an autocatalytic set. X catalyzes the formation of Y from f_1 (cycle C) while Y catalyzes the formation of X from f_2 (cycle C'). Every reaction stage is catalyzed by a single molecular species.

What are the implications and limitations of the Kauffman model? First, it is worth noting that, although the model was initially formulated in the context of peptides, it applies more generally to any polymer capable of catalyzing reactions involving other similar polymers. Peptides were chosen for the sake of plausibility given that the probability P is deemed to be higher compared to other biopolymers. Second, the model establishes a direct relationship between physicalchemical properties and the emergence of self-reproduction. The existence or absence of an ACS is determined by only two parameters, probability P and maximum length L , which can in principle be measured experimentally. One caveat though is the probabilistic character of the model, leading to the third point: the definition of P . The original definition implies, after

some calculations, that every species must be a catalyst as L becomes larger, which was criticized as non-realistic⁷¹ (for discussion on alternative parameterizations, see e.g. Vasas *et al.* 2012).¹¹ Other refinements may include non-uniform P and constraints on the nature of catalysts.⁷² However, the main loophole in the initial model was to not explicitly account for reactants.

A framework taking into account the role of reactants in ACS was then developed and denoted RAF-theory for ‘Reflexively Autocatalytic and Food-generated’.⁷³ The chemical species available in the environment are called the food-set. In a RAF, all catalysts must be food species or products of one of the reactions, and it must be possible to produce all species outside of the food-set by a chain of reactions of the set starting from the food-set. In these chains, reactants of a certain stage must be produced at a preceding stage, but it is not specified whether this is the case for catalysts. The conditionality of reactions on already produced catalysts is actually critical for evolution, as we discuss in the next subsection (Section 5.1.3.ii). The emergence of ACSs in a Kauffman-type polymer model was re-assessed with the RAF formalism.⁷² The presence of a RAF-set is guaranteed when the average number of catalyzed reactions per species grows at least linearly with the maximum polymer length L , consistent with the number of potential reactions scaling as L times the number of species.

So far, the dynamics of autocatalytic sets has been studied on a case-by-case basis or under simplifying assumptions. In the regime where only catalysts are limiting, or equivalently where all reactants are provided in excess from the environment, ACSs follows first order kinetics.⁷⁴ This means that the production rate of a species is a linear combination of the concentration of other species (potentially several of them). This regime is relevant to experimental studies of ACSs made of RNA presented in the next subsection (Section 5.1.3.ii), where it is well verified for early reaction times and stationary regimes may establish across serial transfers.^{75,76} This first order approximation fails when the reactants become exhausted in a closed compartment so that the first order rate must be replaced by models accounting for substrate concentrations, e.g. Michaelis-Menten kinetics. The first order approximation fails even more dramatically if certain reactants are not provided from the food-set, notably for reactions which reactants are products of other reactions. In this case, stochastic simulations (Gillespie algorithm) can be used.⁷⁷ It was in particular shown that nested ACSs, where a downstream product catalyzes every of its upstream reaction stages, are able to sustain the formation of large polymers.⁷⁸

5.1.3.ii. Evolution in autocatalytic set theory

ACSs have been theoretically shown to be capable of evolution¹¹ but the debate surrounding this possibility may have been confusing in the recent times, which we try to clarify here.^{10,79} A first part of the debate concerns the GARD model, where micelles grow by assimilation of different types of surfactants as a function of the surfactants they already contain (Figure 7).⁶ Note that GARD is a model of self-reproduction by collective (mutual) catalysis, but may not be considered as an ACS. However, this distinction depends on a choice of coarse-graining of the chemistry.⁶⁵ The GARD model provided the first theoretical example of multiple

compositional attractors in a system with exponential growth, thereby enabling heredity (see the Introduction), meaning a similar surfactant composition across lineages of micelles resulting from cycles of growth and division.⁶ A computational study of the GARD model suggested an imbalance between variation and heredity, presumably preventing a sufficient level of selection to stabilize compositional attractors.¹⁰ Although heredity was visible along particular lineages, the particular choice of parameters did not allow a robust maintenance thereof at the population level, leading to frequent random transitions toward attractors that are not under selection. The conclusion was that the GARD model lacks evolvability (understood as: micelle composition is too fragile across generations in order to stabilize the attractors under selection) so that evolution could further proceed in an open-ended manner from these attractors. We will come back to certain subtleties of this at the end.

We present now a second study which positively answers the question of ACS evolution.¹¹ This study is based on a polymer condensation-fragmentation model similar to the Kauffman model, taking into account the role of reactants as in RAF. Evolution relies on the existence of multiple compartmentalized ACS networks. Some of them do not spontaneously emerge from the foodset but require the rare appearance of species in order to start. From this point, we call X such an initially rare species and C_X an ACS that is conditionally dependent on X . By ‘nonspontaneous’ we mean here the impossibility to produce X by stepwise iterations of the reaction set starting from the food-set and imposing that both reactants and catalysts must have been produced at a given step for reactions to proceed at the next. An elementary evolutionary transition would then occur as follows: (i) the initial state is characterized by certain species being produced from the food-set in a sustained and autocatalytic manner; (ii) a rare side reaction then occurs and leads to the production of one or a few X molecules; (iii) the autocatalytic core C_X then starts; (iv) if C_X increases the survival of the compartments containing it, ACS networks comprising C_X will increase in frequency in the population of compartments. In this scenario, the rare appearance of X plays the role of a mutation and the self-sustaining character of C_X makes this variation heritable. In such model, reaction rates and concentrations can be tuned so that variation and heredity are balanced and allow stabilization of the states under selection, as exemplified in references Vasas et al. 2012 and in Hordijk and Steel 2014.^{11,77}

We now come back to ambiguities in the debate on evolution in models of collective reproduction, such as GARD and ACSs. These formal issues reveal a lack of generally accepted criteria for three fundamental points: the plausibility of a scenario, the Darwinian character of evolution, and the definition of open-endedness. The first question is that of plausibility. It is not completely clear whether evolution is impossible in the original version of the GARD model, as its parameter space has not been exhaustively sampled. This model may be merely considered implausible if the required parameters need to be highly fine-tuned. However, in this case, compositional attractor heredity should not be rejected in general as it could have acceptable working ranges in other implementations. A second question is the criterion for identifying evolution in the dynamics of a physico-chemical system. Darwinian evolution can result in stationary distributions of states with random transitions between these states (Markov chains), the effect of selection being to alter the distribution. In particular, such dynamics corresponds to the quasi-species model of polymers under template-based replication where states are

encoded in genome sequences. The same phenomenology is observed in the GARD model and is not in itself a criterion for rejecting Darwinian evolution. Criteria for Darwinian evolution thus need to be clarified in the light of the relationship between the phenomenology at the population level (the time course of species frequencies) and the mechanisms underlying variation, heredity and selection. The third question is the open-ended character of evolution. The criticism for a lack of evolvability of GARD entangles two factors: the fragility of selected compositions and the impossibility for open-ended evolution. By nature, the GARD model explores a finite number of attractors. This led its authors to propose a version where covalent bonds between surfactants are possible in addition to self-assembly, opening the space to combinatorial diversity as for any other heteropolymer.⁷⁹ However, whether a system is capable of Darwinian evolution or open-ended evolution are two different things. Darwinian evolution is very well possible between only two states as shown in the textbook example of color evolution of black and white peppered moths during the industrial revolution.⁸⁰ Although the final aim is to discover systems capable of open-ended Darwinian, this should not discard investigations of systems capable of Darwinian evolution between a finite number of states, as a mean to understand general principles for Darwinian evolution.

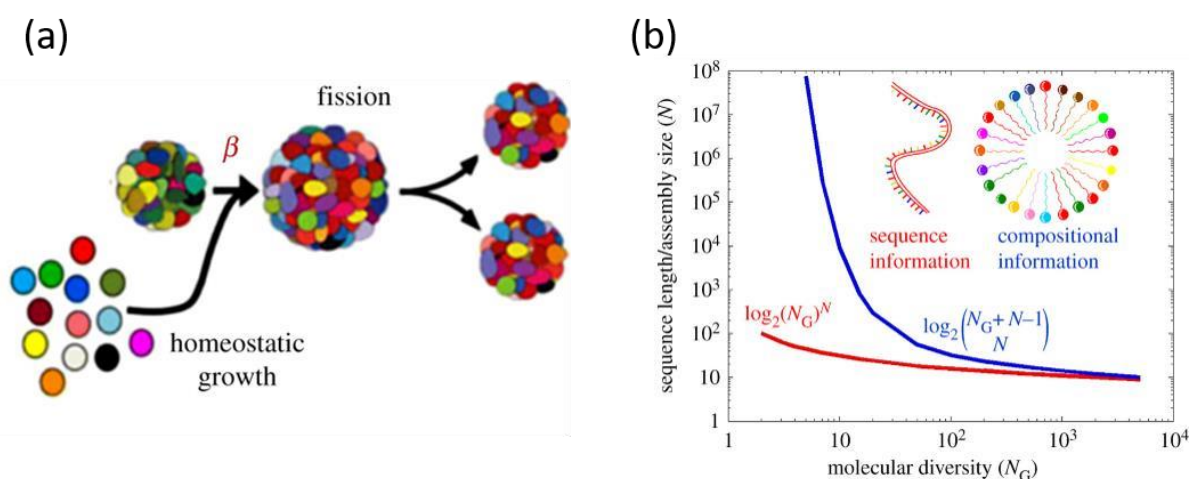


Figure 7. (a) Visual representation of composomes dynamics according to the GARD model. The elementary colored balls represent different amphiphiles molecules. They aggregate into dividing multi-colored micelles, referred to as composomes. (b) Graphical representation of the comparison between genetic polymers (red curve) and composomes (blue curve) regarding their ability to store information. The x-axis stands for the size of the molecular repertoire (N_G) and the y-axis stands for the sequence length or assembly size (N). The curves represent the sequence length or the assembly size required for encoding 100 binary bits by a genetic polymer or by a composome. At high molecular repertoire (achievable in messy prebiotic chemistries), compositional and sequence information require asymptotically equal length. Figures adapted from reference⁷⁹.

Overall, the possibility for Darwinian evolution in ACSs has been shown on the basis of examples^{11,77} and general principles still need to be discovered. Very much needed is a characterization of the reaction schemes which enables heredity, notably using experimentally feasible mechanisms. An example of mode of heredity is realized by nested ACSs structures suggest cumulative heredity, where certain species tend to self-sustain once they reach a certain concentration threshold, but still depend on the maintenance of pre-existing ones.⁷⁸ Studies on

the evolvability of the different models also reveal that despite variation, heredity, selection being possible, it is not obvious to find regimes where they combine appropriately for evolution.

Alternatively, on the basis of these elementary evolutionary properties, different forms of evolution should be considered in addition to canonical Darwinian evolution. Compartments, or any form of spatial segregation, play a central role in all models as they provide units of selection for the collective of chemical species involved in ACSs.⁷⁹ Yet another generic requirement for evolution is the multiplicity of ACSs in a same reaction network.¹¹ In this regard, an issue in the Kauffman model or its generalizations is that as soon as one ACS is present, then all species are part of a single giant ACS except for fine-tuned probabilities of catalytic interactions, a generic feature of percolation phenomena.⁷² Finding whether it is sufficient to consider the dynamics of ACSs nested within a single giant ACS or if instead, one needs to consider specific forms of percolations, still needs to be investigated. Beyond these theoretical questions on ACSs, identifying the range of accessible mechanisms and parameters critically relies on experiments. Group I intron ribozymes have been successfully used to build experimental ACSs. We describe the related recent advances in Section 5.1.4.iv, and we describe now the potential of the family of molecules in regards with the dynamics discussed in this chapter.

5.1.4. Synthetic RNA evolution using engineered group I introns ribozymes

5.1.4.i. The catalytic chemistry of group I intron ribozymes

Natural group I introns are the first-ever discovered ribozymes that lent more weight to the RNA world hypothesis (Figure 8).⁸¹ Regarding this hypothesis, RNA may have supported evolution of early modes of life before the advent DNA and proteins.^{82,83} Indeed RNA sequences have in principle the same information-encoding capacity as DNA, and RNA catalyzes a broad set of chemical reactions similar to proteins, including RNA synthesis.⁸⁴ The various transesterifications catalyzed by engineered group I intron made them a privilege tool to implement evolutionary properties in chemical systems.

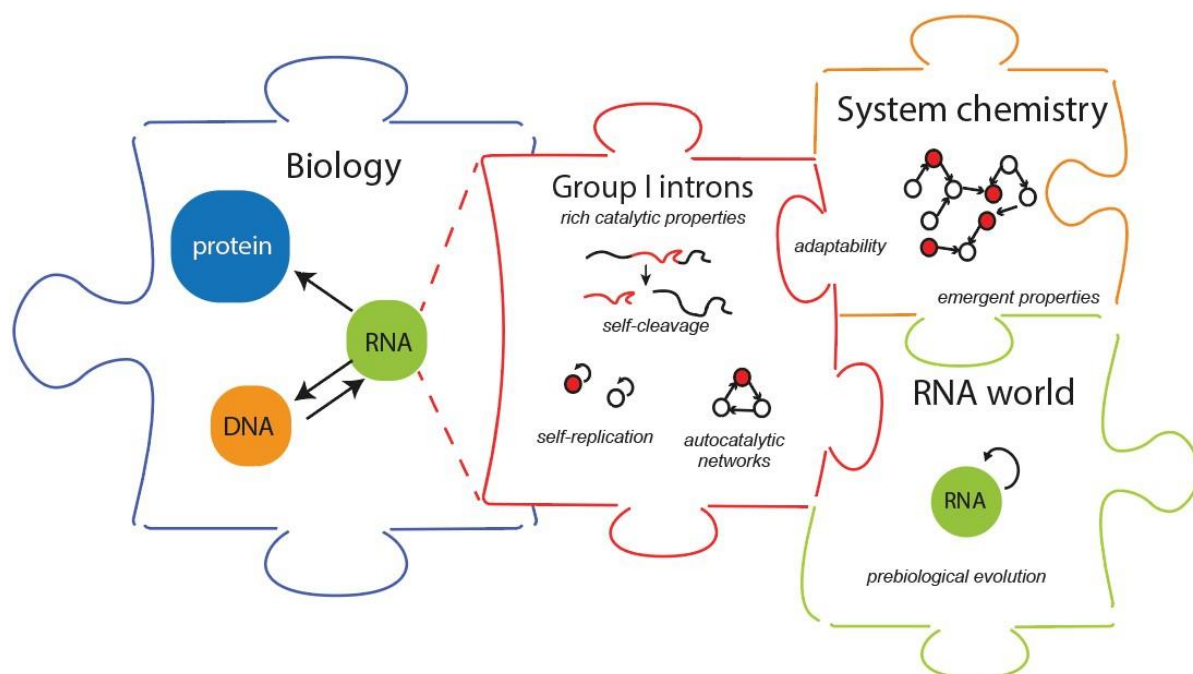


Figure 8. The central dogma of molecular biology is a foundation of evolving systems. In biology, RNA mediates DNA-to-peptide transformation. Since natural RNA functions are widespread, including encryption of information and catalysis, this molecular tool is conceptually capable of evolutionary behaviors. Rationally designed variants of group I introns can display Darwinian properties such as self-replication and autocatalysis in networks⁸⁵. These features can be harnessed to study the origins of life and the RNA world hypothesis to build evolvable systems in the broader context of system chemistry.

The group I introns were discovered as catalytic RNAs broadly spanning biological organisms, being reported in at least ~17 000 of them.⁸⁶ They have been extensively studied during the 80's and 90's and engineered to order to implement template-based replications. The discovery of *in-vitro* evolved ligase ribozyme into polymerase set aside research on Group I intron in that direction. However, Lehman and coworkers took up Azoarcus Group I intron in the mid 2000's in the direction of self-assembly, and non-templated self-reproduction including collectively autocatalytic sets. In this part we show how 40 years of research on the chemistry and the following dynamics can serve as a valuable modular toolbox to implement evolutionary dynamics in chemical systems, especially coupled with innovative technologies such as Next Generation Sequencing.⁸⁷

These natural ribozymes can be used in synthetic systems and how they enable a broad of range of reaction schemes. The diversity of transformations, outlined in Figures 9 and 10, is derived from a basic reaction of phosphodiester exchange, the reversible formation and breakage of phosphodiester bonds. In the biological context, stepwise phosphodiester exchange enables self-splicing, resulting in the covalent attachment of exons (RNAs flanking the intron).⁸⁸ The process starts with the binding of a free guanosine (G) triphosphate to a dedicated G-binding pocket formed by the intron (Fig. 9a). In this state, the 3'-OH of the bound G breaks the 5' exon-intron bond at a specific position and attaches the incoming G to the 5'-end of the intron. This corresponds to the *1st step of self-splicing*. The attack site is dictated by intron's IGS

(internal guide sequence) that binds to the 5'-exon's tag sequence via base pairing.⁸⁹⁹⁰ Importantly, the terminal nucleotide is involved in a wobble pair with a nucleotide from the IGS (e.g. G and U).⁹¹ After cleavage, the IGS-bound tag becomes the 3'-terminus of the 5' exon which subsequently breaks the 5'-intron-exon bond, releasing the intron from the original construct. This corresponds to the *forward 2nd step of self-splicing*. Importantly, the 3' guanosine of the resulting intron can break the newly formed junction between the two exons, which corresponds to the *reverse 2nd step of self-splicing*. The 3 natural reactions schemes described (*1st step of self-splicing*, forward and *reverse 2nd steps of self-splicing*) serve as a nomenclature to describe the different reactions schemes carried out by modified group I intron detailed below.

In a synthetic context, the phosphodiester exchange reactions can be generalized and applied to various synthetic RNA substrates. The resulting transformations include site-specific cleavage, strand ligation, strand exchanges, polymerization and circularization. Such reaction schemes can be broadly categorized as recombination since they involve the exchange of chemical groups between substrates, conserving the stoichiometry of bond breakage and formation. The recombination reactions could be implemented by *cis*-acting ribozymes, i.e. catalysts acting within a single RNA fragment, and *trans*-acting ribozymes, i.e. introns acting on exogenous RNA substrates. This requires the IGS to become available to bind exogenous RNAs, achieved by synthesizing the *trans*-acting ribozymes without their flanking exons and the short RNA sequence preceding the IGS. Similar to *cis*-acting catalysts, *trans*-acting ribozymes can perform cleavage and ligation of RNAs positioned at their IGS. Below, we provide a concise summary of different reaction schemes catalyzed by group I introns (Figure 9) or by 3'-Guanosine-primed group I intron (Figure 10).

Site-specific cleavage (Figure 9b). Group I introns can be repurposed into endoribonucleases – catalysts of the site-selective cleavage of exogenous RNA substrates. RNA cleavage occurs downstream of a sequence complementary to the IGS,⁹² and extending the cleaved RNA 3' fragment by G at its 5'-end. The specificity of the nuclease activity is ensured by the binding of the substrate to the IGS.⁹³ After cleavage, the RNA substrate typically has U as a 3'-end base, which forms a wobble base pair with the G base of IGS. Yet, the sequence specificity of ribozyme-mediated cleavage could be changed by introducing other IGSs and thus applied to a broader scope of substrates.⁹⁴

RNA-editing (Figure 9c). RNA-editing, also known as RNA-repair or RNA-reprogramming,⁹⁵ is a biotechnology strategy to correct messenger RNA sequences in vivo. These processes can be realized through trans-splicing by engineered versions of group I introns. In the original design strategy, the ribozyme sequence is extended at its 3' by a 200 nt fragment (strand C). This fragment can further replace another fragment (strand B) ligated to a target RNA strand (strand A) that is produced by G-promoted cleavage.⁹⁶

Single nucleotide extension (Figure 9d). Group I intron ribozymes elongate single-stranded RNA that binds to the IGS by adding either of the four nucleotides. The nucleotides are supplied in the form of a dinucleotide, with 5'-guanosine acting as a leaving group.⁴⁶ Although the process allows for the incorporation of only several nucleotides, this provides a proof-of-concept for intron ribozymes catalyzing RNA polymerization.

Hairpin and cyclic RNA synthesis (Figures 9e and 9f). Two partially hybridized RNA strands can be covalently joined by the intron ribozyme into a hairpin and – upon repeating the reaction – into cyclic RNA. The reaction starts with the attack of the IGS-bound RNA (strand A) at the proximal phosphodiester bond.⁹⁷ The attack occurs downstream from a G base and is promiscuous in case of several Gs in the attacked fragment. When the 3'-end of the other RNA substrate is also complementary to IGS (strand B), the same mechanism is applied, leading to RNA circularization.⁸⁷

The examples above highlight the applications of group I introns in catalyzing reactions between RNAs, involving exogenous guanosine substrates. Often, intron ribozymes are synthesized with a G base at their 3'-end to promote the succession reactions similar to the forward and reverse reactions of the second step of self-splicing, in order to promote transplicing exchanges elongation by polymerization of small fragments.

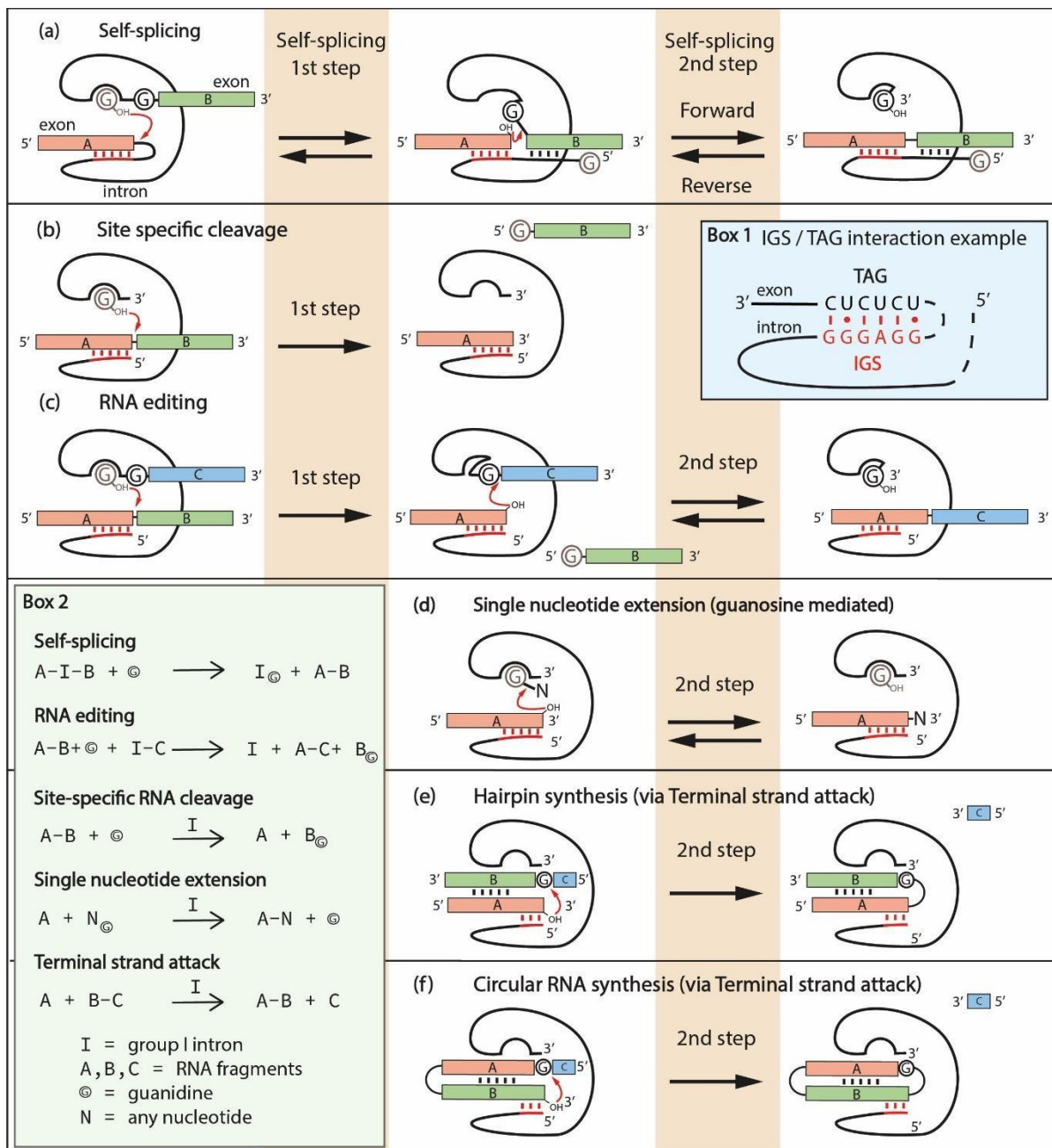


Figure 9. Reaction schemes catalyzed by group I intron ribozymes. The structure of group I intron ribozymes in a folded state is represented as a curved black line. Catalytically active ribozymes contain a G-binding pocket and a recognition site (IGS) at the 5'-end, in red, which binds to the tag sequence of RNA fragments (depicted by red dashed lines). RNA hybridization is represented with dashed lines. (a) Self-splicing in group I introns from cellular RNAs occurs in two consecutive steps.⁸⁸ The A and B fragments are natural exons flanking the intron ribozyme. (b) Endonuclease activity exerted by group I introns leads to the site-specific cleavage of an RNA downstream the tag sequence.⁹⁸ (c) RNA editing is implemented by an intron ribozyme carrying a replacement fragment C.⁹⁶ (d) Single nucleotide extension mechanism involves the attack of GN dinucleotides (G nucleotide bonded with A, U, G or C nucleotide) by the RNA substrate 3' OH leading to its extension by one nucleotide.⁹² (e, f) The synthesis of hairpin (e) and cyclic (f) RNAs requires partial complementarity of two RNA substrates.

Trans-splicing exchange (Figure 10a). The trans-splicing mechanism enables the exchange of different RNA fragments.⁹⁷ Here, the ribozyme catalyzes indefinite number of exchanges, unlike for RNA editing (Figure 9c) where the ribozyme is for single use. The 3'-end guanosine of the ribozyme attacks a phosphodiester bond downstream of the IGS-tag recognition domain. This reaction leads to the covalent attachment of an RNA fragment (B strand) to the ribozyme. Another RNA substrate (C strand), possessing the same tag sequence, competes for binding to the IGS with the former RNA fragment (A strand). Once bound, this RNA can be extended through the trans-splicing mechanism.

RNA elongation by fragments polymerization (Figure 10b). Group I intron ribozymes can catalyze repetitive additions of small RNA fragments.⁹⁹ A 20 nt RNA substrate is cleaved into two 10 nt fragments, and one becomes a 3'-end of the ribozyme. The thus extended ribozyme is catalytically active and continues to process the original RNA substrates, gradually adding 10 nt fragments (strands B) at the 3'-end. The growing chain of these fragments is finally removed from the ribozyme by RNA bound to the IGS. As a result, the original substrate can be appended with up to 180 nt. However, this scheme has been implemented with fragments similar to intron sequences involved in self-splicing. A route to overcome the sequence specificity of polymerizable RNA fragments was proposed (Repeated Transfer, figure 10c) using RNA substrates with a terminal 3 nt-long tag complementary to the IGS react with the intron, and fragments located downstream of the tag can be transferred to the ribozyme. The design strategy requires the introductions of several tags in the original RNA substrates. This principle enables the repetitive transfer of ribozyme-bound fragments both to the original and already extended substrates (strands B). This polymerization mechanism is reminiscent of the polymerization strategy of Zaug and Cech, but allows a greater number of addition and is extended to various oligomers (up to more than 20 oligomers added) instead of single nucleotides (not more than 5 nucleotides added).^{87,92}

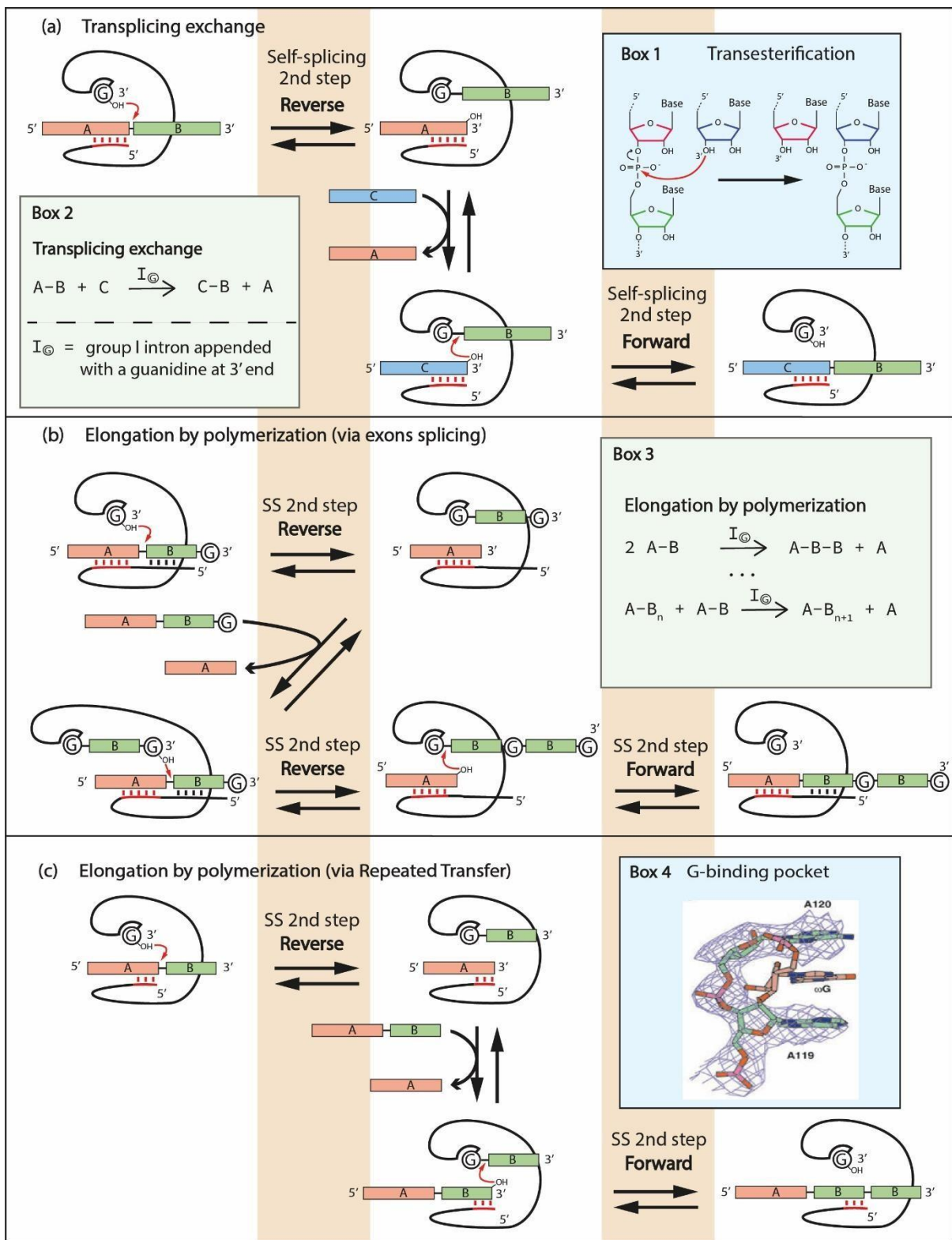


Figure 10. Reaction schemes catalyzed by 3'-guanosine-primed group I introns ribozymes . (A) Swapping RNA fragments between different substrates.^{92,100} (B) RNA fragment polymerization by mimicking 3'-end of the ribozyme (C) RNA fragment polymerization by introducing several tags in the sequence of RNA substrate.

In summary, using a single type of catalytic mechanism, a phosphodiester bond exchange, group I introns are capable of catalyzing a wide range of reaction schemes. These transformations include site-specific cleavage, strand ligation, strand exchanges, fragments polymerization, and

circularization. By applying recombination strategies, it is also possible to generate catalytic RNA - hammerhead and ligase ribozymes^{101,102}— from two non-functional RNA molecules. Some of these reactions schemes are known for many years (e.g. site specific cleavage) and other has been recently discovered (e.g. Repeated Transfer). We believe that the gathering of all this schemes could offer a valuable toolbox to engineer integrated and modular RNA systems with evolutionary properties, such as in initiated by¹⁰³.

5.1.4.ii. Group I intron ribozymes structural organization and fragmentation

In their native form, group I introns are incapable of catalyzing template-based replication because they do not catalyze energy-rich chemistries or act as a template in their biological context. However, their engineered versions enable certain aspects of template-based replication, such as multiple template-directed ligations.

One of the biggest challenge is to bring about a replicase that would display a processive strand displacement activity.⁴⁰ This means it would not only copy a single-stranded RNA into its complementary fragment, but would also be able to copy the strands involved in the doublestranded newly formed RNA in order to maintain indefinitely the replication process. Among the solutions proposed, two of them catch our attention: the making of minimal ribozymes and fragmentation of preexisting ribozymes. The first strategy not only increases the plausibility of appearance of such a molecule but it requires less processivity, since the template is shorter. The second strategy offer the same benefits as the first in term of size, however the resulting fragments are designed to self-assemble into a functional bigger non covalent complex ribozyme (here called trans-complex-ribozyme). These strategies require to understand how ribozymes can be structurally simplified or fragmented. In particular, trans-complex-ribozymes are obtained by fragmenting ribozyme parts that have a small contribution to the stability of active 3D folds (Figure 11a).^{104–114,47,115,116} Often, these parts consists of peripheral loops in the secondary structure. Additionally, entire ribozyme segments can be erased; in this case, the drop in catalytic activity could be counteracted by in vitro evolution.^{117,118} Below, we highlight reported fragmentation strategies and their relationship with group I intron structure.

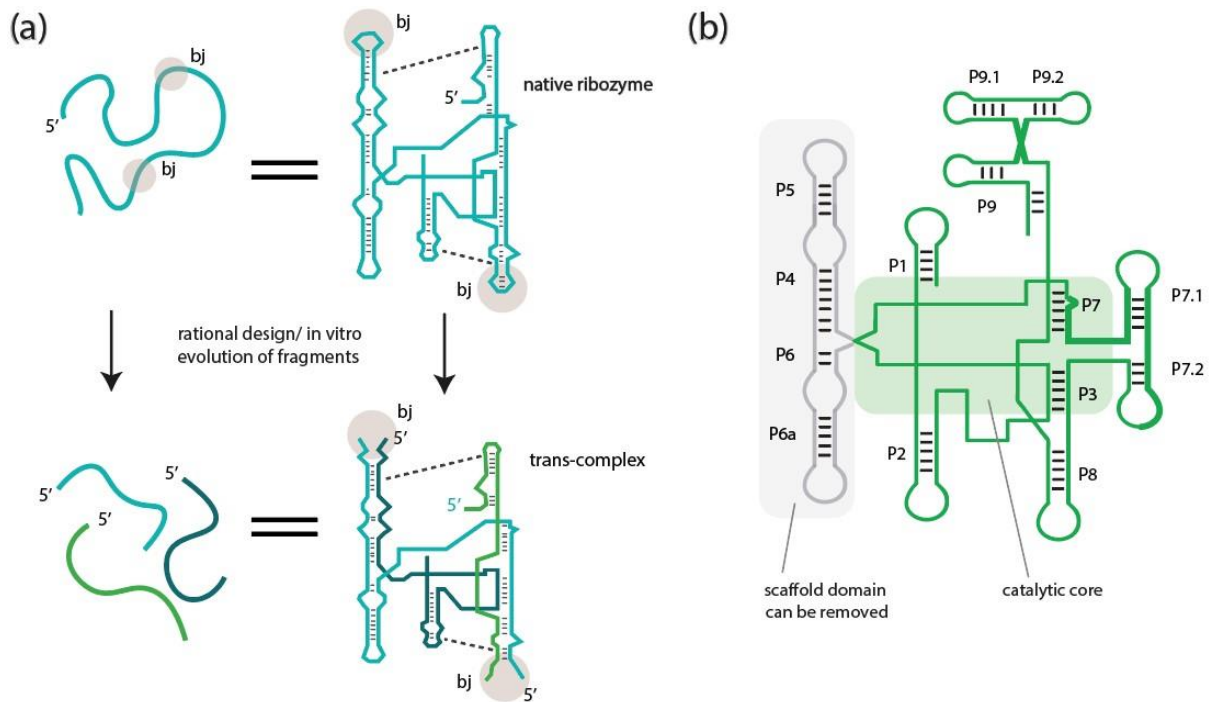


Figure 11. Group I intron ribozymes structural organization and fragmentation (a) Engineering fragmented group I introns trans-complexes. The grey zones indicate the "broken" or "to be broken" nucleotidic bonds, i.e. the "break junctions" (bj). The breaking vocabulary has to be taken figuratively, since no bond is cleaved in the process that only consists in assembling the designed fragments. Base pair interactions are depicted as a solid line, tertiary contacts as a dashed line. (b) Group I introns can be organized in two domains: the catalytic properties of the ribozyme are defined by a catalytic core (green background) and the scaffold is involved in the folding and the stability of the ribozymes. The entire scaffold domain (P4P6) can be removed for certain ribozymes but it is not a generality of the family.¹⁰⁶

The structural organization of catalytic Group I introns has been studied by crystallography, bioinformatics, controlled mutagenesis and engineering.^{104,105,107,108,110,119–122} The ribozymes share a conserved pseudo-knotted secondary structure which folds into two helical domains: a scaffold helix and a catalytic core (Figure 11b). Each family member is composed of several paired regions (often referred as P regions, P1 to P10) linked by unpaired joining regions (J regions).¹²³ Functional introns adopt a specific tertiary structure dictated by Watson-Crick base-pairing of the nucleobases and by strong long-range base contacts. The existence of connections between remote RNA segments, not obeying Watson-Crick base pairing, was demonstrated by selective mutagenesis¹²⁴ and nucleotide analog interference mapping.^{125,126} The group I intron family has been divided into 14 subclasses according to the sequence conservation of the introns and the presence of additional peripheral subclass-specific domains.^{104,127} Although the catalytic core and a part of the scaffold domain is highly conserved (P4, P3 and P7), the group I introns exhibit a large sequence diversity, generated by the combination of these additional domains.¹⁰⁷

Breaking bonds in ribozymes leads to little or no activity, depending on the position and number of introduced disconnections. The latter parameters are directly linked to the ability of the fragmented RNAs to fold accurately. Inoue et al. showed that removing an entire domain (P5abc) renders the final construct inert.¹¹³ However, the addition of the removed fragment

restores catalytic activity; the non-covalent interactions between the two strands were confirmed by gel-mobility shift assay. The same intron ribozyme was later cut into a threecomponent trans-ribozyme,¹¹⁴ composed of a catalytic domain (P3/P9), a scaffold domain (P4/P6) and a substrate domain (P1/P3). The fragmented ribozyme assembles into an active trans-complex with a high association constant via strong and selective tertiary contacts between remote regions. To find the minimal catalytic center, the scaffold ensuring proper folding of the T4 td group I intron ribozyme was removed.¹⁰⁶ The stripped RNA containing the catalytic core retained the ability to catalyze RNA recombination (Figure 11b). Although the overall catalytic activity of such a construct was reduced compared to the native substrate, the catalytic rate was far above non-catalyzed reaction by using high concentration of Mg²⁺ and adding polyamines. The stabilization of the reduced construct was also achieved by intramolecular loop-loop interactions between the catalytic core and the remaining peripheral domain (P7.1, P7.2) that ensured a proper folding of the catalytic center. Overall, the works revealed essential insights into RNA structure-catalytic activity relationship to design synthetic ribozymes from natural group I introns. Indeed, these design principles can be extended to make chimeric ribozymes.¹⁰⁸

5.1.4.iii. Attempts toward template-based RNA replication with group I introns

Recombination as a mechanism of template-based ligation. Template-based ligation of activated nucleotides is a central process of molecular replication in biology. Group I introns enable this reaction by using energy-neutral chemistries and G bases as a leaving group. The primary limitations to match biological replication include a limited number of nucleotide additions and fidelity of replication. To achieve template-based replication in RNA, Doudna and Szostak fragmented the recognition domain of the Tetrahymena ribozyme (in blue in Figure 12a) from the remaining sequence (in green) and split the recognition domain embedded in two strands (in blue), which became the substrates.⁴⁸ The two substrates are thus one strand acting as a template, possessing the wobble pair characteristic of group I introns (in blue) immediately followed by an unbound G base, and a second strand complementary to the template. The IGSfree ribozyme (in green) catalyzes a nucleophile attack similar to the forward reaction of the Group I intron self-splicing second step (Figure 12a), leading to the ligation of two RNA strands, reconstituting the native recognition domain. The IGS-free ribozyme accepts a broad range of substrates and was shown to ligate up to four RNA strands, yet with low yield, that were annealed to an external template.

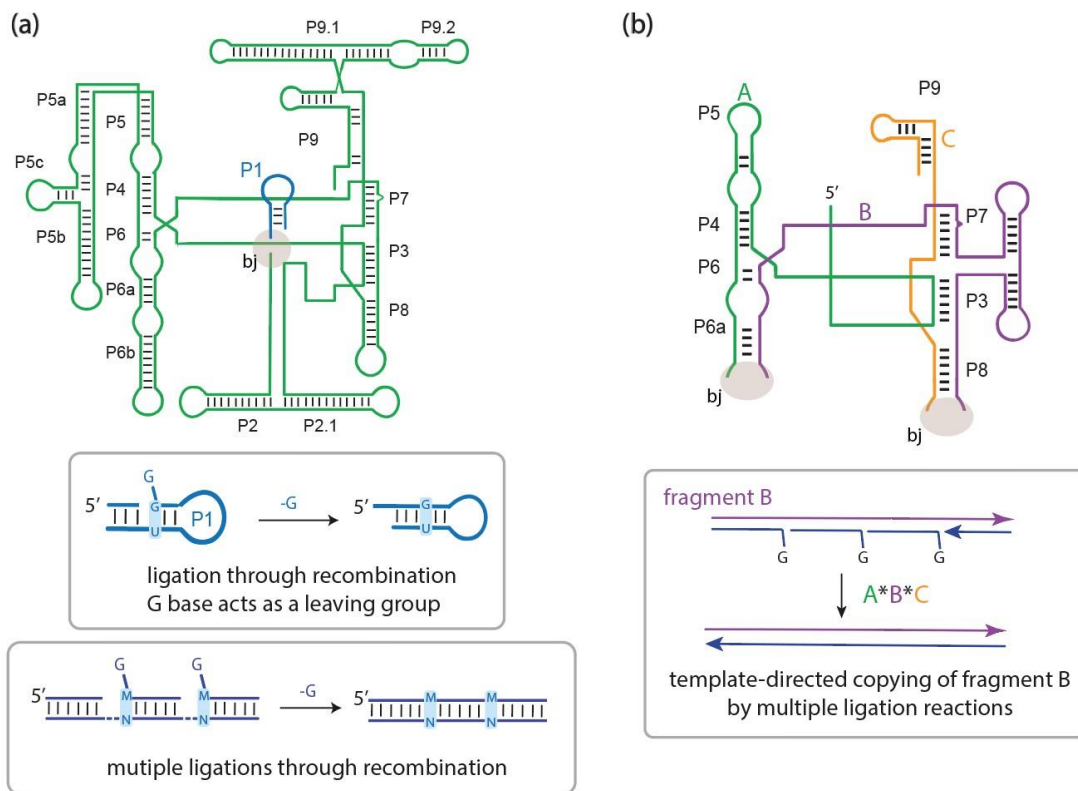


Figure 12. Template-based replication reactions catalyzed by fragmented group I introns.

(a) Multiple ligation reactions are catalyzed by a fragmented ribozyme with various substrates. Tetrahymena ribozyme is dissociated from its P1 fragment. The remaining ribozyme is able to join a two-pieces P1 hairpin fragment together, establishing a template base ligation. Along the same lines it can join several oligonucleotides together associated with a template, this way achieving rudimentary template based replication.¹¹⁵ (b) Once fragmented into 3 pieces, the resulting trans-complex of sunY ribozyme takes fragments with the same sequence as one of its part as a substrate (40 nucleotides long) to perform template-based replication from smaller oligonucleotides.¹¹⁶

On the other hand, fragmentation at peripheral loops introduces minor disturbances to the overall catalytic activity of synthetic ribozymes. This strategy was applied by Doudna and colleagues to fragment a 164 nt ribozyme in three parts.¹¹⁶ Despite the slightly reduced activity, the trans-complex can copy 40 nt fragments with the same sequence as one of its parts into a complementary strand from smaller oligonucleotides (Figure 12.b). Further attempts to implement template-based replication in RNA focused on reducing the full length RNA by coupling rational design, directed evolution, and fragmentation. The motivation behind was to improve the template-directed copying by decreasing the strength and the number of folded motifs within the strands. In the approach undertaken by Szostak and Green, the ribozyme was initially reduced by 20% of its length by removing a small additional domain that fold into two paired helices (P7.1, P7.2).⁴⁷ The remaining ribozyme underwent directed evolution to counteract the severe losses in catalytic activity, and was finally fragmented in three strands at the peripheral loops. Interestingly, the deletion of 20% of ribozyme's length could be rescued by introducing only five mutations. The reduced and evolved ribozyme could be assembled in a trans-complex from three fragments (59 nt, 36 nt, 43 nt). The shortest fragment sequence was

copied into a complementary strand with an 8% yield, different fragments with the same sequence then acting as a part of catalyst or as a template.

In this section, we highlighted the strategies to fragment group I introns into catalytic transversions that were applied for the development of recombinase replicases. Indeed, some of the trans-ribozymes are able to copy parts of themselves using the template-directed mechanism. However, the challenges to develop a fragmented ribozyme that carries out high-fidelity replication by template-based replication through recombination have not been overcome. The obstacles include poor yields, the lack of strand separation after replication, the inhibition of the trans-ribozyme by a complementary strand, and highly demanding nucleotide specificity (IGS-tag recognition) of replication⁴⁴. Some of the problems were mitigated by switching in the mid-nineties to the extensive use of directed evolution and rational design in synthetic RNA ligases and polymerases^{128,129,130}. Another strategy, developed below, is to design replicative RNAs through recombinase-mediated ligation steps, yielding to full-length ribozymes. This line of research was extended to the exploration of replication in networks with a long-term goal of arriving at evolvable chemical systems.

5.1.4.iv. Self-reproduction and autocatalytic set with group I introns

To circumvent the difficulties of template-based replication, an alternative mechanism of molecular reproduction through recombination was proposed by Lehman and Hayden.¹³¹ *Azoarcus's* group I intron was broken at three different junctions in the loop regions to generate four inactive RNA fragments, namely W, X, Y and Z (Figure 13). Combined together, the transcomplex (W:X:Y:Z) was spontaneously converted into a covalently contiguous ribozyme by other trans-complex and subsequently formed contiguous ribozymes. Recently, the formation of the full-length ribozyme from five inactive fragments was reported.¹³² The mechanism of transformation into covalent ribozyme relies on stepwise recombination reactions at the fragmented loops via IGS-tag recognition. The reactions correspond variations of the second step of self-splicing in its forward or reverse direction (Figure 9a). In the synthetic *Azoarcus* system, the two mechanisms co-occur and result in the formation of a mixture of products which can be differentiated by the nucleotide composition at junctions. Since the product of the reaction is a catalyst that can feedback on its own synthesis by recognizing cognate tag, the whole process becomes autocatalytic. The positive feedback of the system was thoroughly tested by Hayden *et al.* here covalent WXYZ catalyst was titrated over the assembly of fragments to measure catalyst dependent rate enhancements.⁷⁴ Similar to *Tetrahymena*, the modularity of *Azoarcus's* group I intron was also exploited by fragmenting it in a 'catalytic' and 'scaffold' units (similar to Doudna *et al.* mentioned earlier) to demonstrate the accumulation of cryptic mutations in 'scaffold module' which brings phenotypic robustness in certain environments.¹³³ In an earlier study, Hayden *et al.* also subjected the mutated libraries of *Azoarcus's* group I intron to directed evolution to show the role of cryptic mutations in adaptation of catalytic RNAs to different substrates.¹³⁴ These studies highlight that group I

intron are phenotypically robust, since they can accumulate mutations without losing catalytic function, that is an important feature needed to build evolvable chemical system.

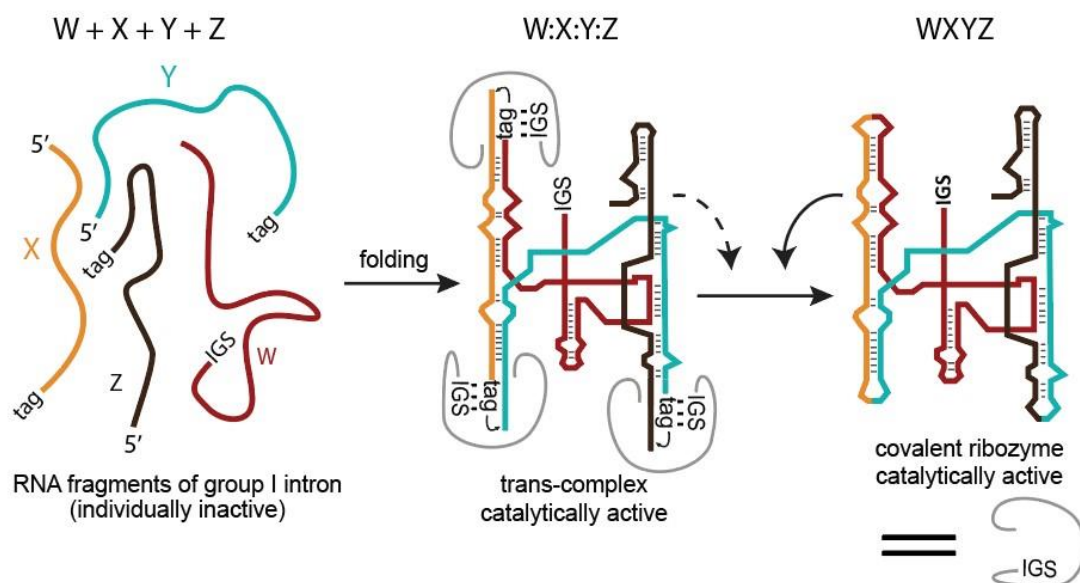


Figure 13. Engineering of *Azoarcus* group I intron to create self-replicating ribozyme system. Schematic representation of fragmenting strategy and self-assembly of RNA fragments to WXYZ (full-length) ribozymes. For the four-fragment self-assembly, fragment 'W' has 3nt IGS at 5'-end, fragments 'W', 'X', 'Y' are modified to contain 3nt tag at 3'end. All four fragments rapidly equilibrate to form non-covalent complex [W:X:Y:Z] (catalytically active) on which catalysts will act to join the fragments through the reaction schemes depicted in Figure 9e and in Figure 10a.

Re-engineered Group I introns were also converted into autocatalytic reaction networks by exploiting sequence modularity of IGS-tag recognition. The part below focuses on the implementations of RNA collectively autocatalytic sets (CAS).

Self-replication from the fragmented *Azoarcus* ribozyme depends on the hybridization of 3 nucleotides long IGS and tag. While the system shows autocatalytic self-replication of a single catalyst, Vaidya *et al.* also constructed cross-catalytic networks by changing the middle of both IGS/tag ('GMG'/'CNU', where M, N can be any of the four nucleotides).⁸⁵ This allowed generation of a network having 48 different WXYZ catalysts (16 IGS/tag pair for 3 different junctions) using which emerging interplay between cooperativity and selfishness was studied in autocatalytic networks. Further, in order to have a better quantification of the catalytic edges in the network (Figure 14), Yeates *et al.* measured kinetic rates associated with all the 16 IGS/tag paired allowing chemical implementations of the game theory where cooperativity and selfishness were compared between nodes (catalysts) of a network using 2x2 pay-off matrix.¹³⁵ Later on, using similar quantification, Yeates *et al.* also showed the effect of adding cooperative vs selfish nodes on the overall growth rate of the networks.¹³⁶

a: abstract representation of a 3-member network

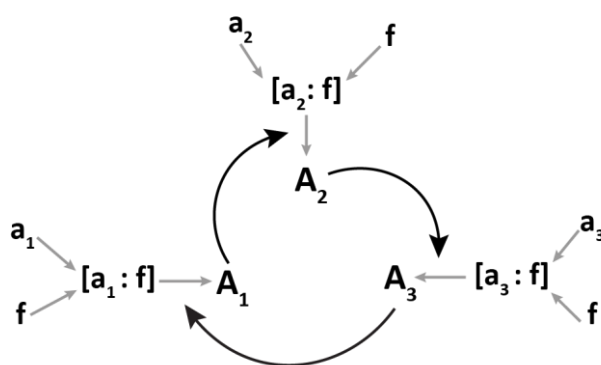


Figure 14. Autocatalytic reaction network formation and node fraction quantification.

Abstract representation of collectively autocatalytic reaction network where a_1 , a_2 , a_3 , f (e.g. WXY_1 , WXY_2 , WXY_3 , and Z) are RNA fragments with 'f' being common substrate to all. A_1 , A_2 , A_3 are covalent catalysts. Black arrows depict catalytic edges.

In order to study Darwinian properties in RNA-based autocatalytic reaction networks, in a recent study, Ameta *et al.* used RNA fragments from *Azoarcus* group I intron to construct >20,000 networks with diverse composition and size (number of nodes).¹³⁷ This was achieved by using droplet-based microfluidics combining with barcoded-sequencing to measure network composition in each droplet at an unprecedented resolution. Using this huge compositional landscape of self-replicating RNAs, generic laws controlling compositional robustness against variations and growth in autocatalytic reaction networks were derived. The study found out that high network connectivity increases the rate of ribozymes' production but at the same time, hampers the incorporation of new catalysts, strengthening the robustness of network topology and composition. Despite that sustainable variation can still occur by targeting weakly connected components of the network with strong catalyst having novel specificities. While the interplay between growth and composition is crucial for evolution, demonstrating compositional heredity in autocatalytic networks is not trivial. In order to check if networks based on the group I intron are capable of compositional inheritance, authors also performed serial dilution experiments where network was perturbed by an initial condition (different $WXY + Z$) and its propagation was measured for 2 generations (transfers). Compared to control, the effect of perturbation was indeed transferred to the next generation however, the compositions tend to converge due to strong background catalysis from the trans-complex ribozyme.

These autocatalytic RNA reaction networks were not only found to be robust against changes in composition but against chemical perturbations at the molecular level as well. In a recent study, Arsène *et al.* showed that the basic descriptors of the replicating molecular networks – the food set (RNA fragments) – could be preserved by an emerging catabolic property of *Azoarcus* group I intron.¹³⁸ The fragments, rendered inaccessible by the addition of a modification, were converted back to native fragment by cleavage of the modified part using a cascade of reactions catalyzed by $WXYZ$ catalysts.

As a result, RNA networks based on the group I intron constitutes a privileged path to Darwinian evolution as they possess self-replication property, compositional diversity, tradeoff between composition variation and robustness. However, the system is still limited by strong

background reaction and the lack of selection strategies where survival of the fittest can be shown under different selection pressures. Combining with a robust selection strategy for selecting composition, Darwinian evolution could be achieved in autocatalytic reaction networks based on RNAs. Such autocatalytic systems can be built using different chemistries^{8,12,74,139–141} and, engineer to acquire several key evolutionary features like diversity¹⁴², bistability¹⁴³, emergence¹⁴², trade-off between Darwinian properties¹³⁷. Consistently, template-based RNA replicator has been also engineered to demonstrate its emergence as components of reaction networks (though not autocatalytic).⁵

5.1.5. Spontaneous emergence of evolutionary dynamics from complex chemical mixtures

All previously discussed experimental systems involve fine-tuned chemical compositions often associated with engineered macro-biomolecules such as engineered Group I intron ribozymes. This sheds light on how to build evolvable chemical systems, and thus also informs how such systems could have appeared in the origin of life. However, if the question were to be constrained by historicity and/or by spontaneity (cf. Chapter 2), one should explain how such systems could emerge from a more plausible messy chemistry. For a long time, complex mixtures have been studied for the search of synthesized building blocks like needles in a haystack. The most famous examples are amino acids synthesis via the Miler-Urey reaction,^{2,144} the polymerization of HCN into adenine,^{7,145} the production of sugars via the formose reaction,^{8,146} and the production of fatty acids via Fischer Tropsch-type reactions.¹⁴⁷ If it is possible to look for specific compounds, on the other hand, analyzing the whole composition of the mixtures and the dynamics of its constituents is a real challenge. Indeed, the combinatorial explosion of reactions ends in infamous "tars", "gunk" or "asphalt" that resist detailed chemical analysis and prevent the disclosure of chemical reactions networks.^{148–150} Looking for emergent evolutionary properties in chemical reaction networks then often goes along with controlled chemical environments. However this goes at the price of potentially losing essential features of complex chemistries that are the hallmark of living systems.¹⁵¹ Harnessing protocols traditionally used in biology to study the behavior of complex chemical systems constitutes new approaches to the problem. Among them are: (i) the study of complex mixtures composition through omics quantitative analyses, (ii) the study of their global properties as systems through bulk measurements, (iii) the study of the emergence of autocatalysis and recursive actions, via non-linear changes in composition and global properties, and (iv) computer-assisted organic synthesis. These approaches allow a phenomenological insight of evolutionary dynamics in chemical solutions traditionally treated mechanistically. However, the field is still at the stage of interpreting these new experiments that do not offer an understanding of all the dynamics detected yet.

How could one follow up the evolution of complex chemical mixtures without accessing its detailed composition? Using an 'omics' approach to characterize their general chemical signature offers a solution. This way, Cronin and coworkers followed the evolution of a

wellknown combinatorial explosion, the formose reaction, in the presence of formamide and different catalytic minerals, with LC-MS measurements.¹⁵² The minerals modified the signature of the products distribution. More interestingly, serial dilutions of reaction solutions in fresh solutions also modify the signature. In addition, the diversity of the composition decreases as the dilutions are made. This way, some compounds may be concentrated, to allow the synthesis of RNA building blocks for instance. Miller-types mixtures are also subjected to this approach^{153,154} showing strong influences of environmental conditions. However, it is still unclear how limitations in combinatorial explosions and changes in compositions could lead to evolutionary properties. At another scale, deep sequencing constitutes another ‘omics’ approach that pictures the composition of genetic polymers solutions. This way, Mutschler *et al.* discover that random solutions of RNA and AtNA (altritol-nucleic acids) display innate property for ligation and recombination making longer polymers and inducing diversity.¹⁵⁵ These reactions are central to the replication and the modification of nucleic acids in actual living systems. Their appearances in complex mixtures could well be a first step toward Darwinian evolution.

Some mixtures resist fine tuned chemical analysis. Jumping from a molecular level to a systems level, “bulk measurements” of messy mixtures may accelerate discoveries related to the origin of life.¹⁵⁶ The aim becomes to generate "observational results about the behavior of messy, complex chemistries, regardless of any immediate interpretation of how this could lead to biology". This approach of functional measurements corresponds to overall properties of complex mixtures and is illustrated by Surman *et al.*¹⁵³ They performed bulk analyses on Millertype mixtures and mixtures of amino-acids by measuring binding properties, the capacity of releasing a particular colored product and observing morphologies of mineral clusters. In addition to the changes in global compositions already mentioned, the measured functional properties of mixtures also diverge depending on environmental parameters (order of reactants, and addition of salts or minerals). Compositions change thus imply functional changes, bringing up a “chemistry with history” often considered as a key feature of biology. This way, Vincent *et al.* reported a similar approach on “prebiotic enriched soups” by measuring UV-vis absorbance, orthophosphate concentration and patterns on pyrites grains.¹⁵⁷

To demonstrate autocatalysis, one needs to determine the autocatalytic species and assess the kinetics of the relevant reactions. However, this endeavor is greatly complicated in intractable mixtures. Following the dynamics of global properties may help to identify such behaviors, like in the study of Vincent *et al.* on “enriched prebiotic soups”.¹⁵⁷ The experiments involve serial dilutions of mixtures with pyrites grains, also included in the transfers, so that molecules adsorbed on the pyrite are selected. Serial dilutions offer a way to follow out-of-equilibrium chemistries in order to track their evolution on the long run. Bulk measurements of global properties are performed (UV-vis absorbance, orthophosphate concentration, and morphological patterns on pyrites analysis) and over the course of dilutions, nonlinear changes in these properties appear underlying a nonlinear chemistry through generations. Serial dilution does have an effect and the authors favor the hypothesis of mutually-catalytic systems developing on the pyrite surface referring to Wächtershäuser's surface metabolism hypothesis.¹⁵⁸ With similar Miller-type broths, Scherer *et al.* detected non-linear changes in overall analytic signatures between the same realizations, implying reaction networks of thousands of substances.¹⁵⁴ In other systems, such as in micellar solutions, the formation and

dynamics of self-reproducing supramolecular structures were even being tracked by optical microscopy.¹⁵⁹ The monitoring of autocatalytic behaviors in complex chemical systems can even be led outside of the organic world. This way, Miras *et al.* performed UV-vis absorbance measurements of inorganic mixtures of molybdenum salts.¹³⁹ Since the absorption is directly linked to some metal oxide clusters concentration, the authors interpret the non-linearity in absorbance as the consequence of autocatalytic processes in this more-than-368-species mixture.

The combinatorial explosion of reactions happening in many complex mixtures prevent to trace back the different networks of reaction. Their rational understanding might yet be crucial to understand the emergence of evolutionary properties. Computer-assisted organic synthesis,¹⁶⁰ that is the coupling between simulation of the reaction mixture and empirical validations, constitutes a way to bypass this issue. Wołos *et al.* report a forward-synthesis algorithm generating a full networks of reactions from several Miller-types mixtures in generally accepted prebiotic conditions.¹⁶¹ They discovered new pathways of building blocks synthesis associated with the emergence of autocatalytic cycles, which they empirically validated in monitored isolated experiments.

The above methods show that complex mixtures undergo changes in composition and in global properties (Figure 15). They can be non-linear and environment dependent, when transferred or not by serial dilutions. Protocols are being optimized to detect such evolutions, up to the recent implementation of a “robotic prebiotic chemist” that consist in a fully automated way of monitoring and analyzing complex mixtures for weeks.¹⁶² However evolutionary changes in complex mixtures and their possible relations to Darwinian evolution remain to be discovered.

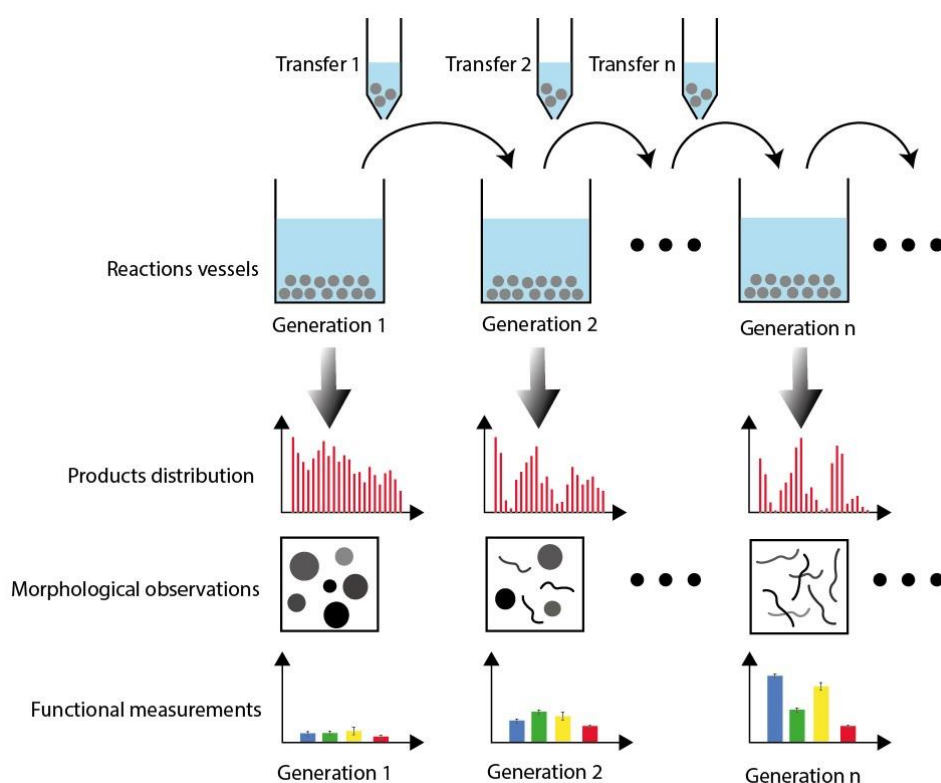


Figure 15. Long-term dynamics of complex chemical mixtures can be traced along serial dilutions. Global changes in compositions, morphological patterns and functional properties can be assessed without analyzing the composition at a molecular level. These changes, in

particular the non-linear ones, might be correlated to the emergence of complex autocatalytic networks. Even if a direct link with the emergence of Darwinian evolution remains unclear, these systemic approaches offer an avenue for the study of evolvable complex mixtures.

5.1.6. Conclusion and discussion

Replicating systems are diverse in the nature of their chemicals (small molecules, biopolymers, organic or inorganic chemicals) and the underlying reaction schemes (overlapping catalytic cycles, polymerization, recombination, ligation ...). It is also becoming increasingly accepted that evolution can build up from autocatalysis in different manners. Darwinian evolution has been classically identified with the template-based replication of heteropolymers associated with lineages of compartments under selection, as a generalization of what is observed in biological cells. However, the definition of Darwinian evolution is more general, that is the combination of variation, reproduction with heredity and selection.⁴ Template-based replication is one possible mechanism, but autocatalytic systems without it have a potential for realizing and combining the Darwinian properties as well. Specifically, variation may arise from rare side-products (which may be triggered by a transient internal or external event), reproduction with heredity occurs when variations are coupled to an autocatalytic pathway, and selection is expected from any change in chemical composition that alters the relationship of the system with its environment.¹¹

Darwinian evolution is not only more general than template-based replication, but evolution itself is more general than Darwinian evolution. For instance, relaxing the need for selection provides a first generalization: evolution may be neutral and still enable non-adaptive drift among a set of heritable states.¹⁶³ Furthermore, Darwinian evolution assumes the existence of lineages of compartments (or at least physically distinct entities) that serve as units of selection. Modes of evolution more general than canonical Darwinian evolution can be obtained by combining Darwinian properties without strict compartment lineages. One such possibility is illustrated theoretically and experimentally for template-based replicators in transient compartments.^{42,43,164} Transient compartmentalization enables the evolution of lineages of replicating molecules in the absence of lineages of compartments, but where selection occurs at the compartment level. Such non-Darwinian forms of evolution are even conceivable in the absence of multiple compartments. In particular, reproduction with heredity and a diversity of heritable states allow a form of evolution in a single reaction vessel: a variation event (e.g. the appearance of a new chemical) triggers a novel self-sustained state.^{67,165–167} In this case, the existence of multiple non-equilibrium steady-states in the exact same conditions is a feature that distinguishes such evolutionary dynamics from a mere change caused by a permanent change in the environment, as when water goes from liquid to ice while lowering the temperature (out-of-equilibrium counter examples would work as well). These different modes of evolution may be adaptive or non-adaptive, which requires a careful analysis of the causal relationships between external and internal changes. Overall, considering regimes that involve evolutionary

properties combined in a non-Darwinian manner together with their compartmentalization protocols is a promising avenue of research, with direct implications for experiments.

The viewpoint developed throughout this chapter is that evolution is a much broader phenomenon than strict Darwinian evolution of compartment lineages coupled with template-based replication. For instance, in the origin of life, evolution may have appeared based on collective self-reproduction before template-based replication during the origin of life. We have notably presented recent theoretical and experimental developments in this direction, and we have particularly shown the usefulness of engineered Group I intron ribozymes to serve as a toolbox to implement such dynamics. On one hand, this hypothesis is worth exploring because collective self-reproduction requires simpler catalytic activities or physico-chemical conditions than those required for template-based replication. On the other hand, evolution in the absence of template-based replication is not obvious, but this possibility has so far been neglected merely due to a lack of theoretical understanding. Yet, the hypothesis of evolution without template-based replication is only at a preliminary stage of investigation, and a number of steps need to be overcome.

Therefore, to conclude, we list three main challenges on the path to establish scenarios of evolution based on collective replication before the advent of template-based replication:

1) We need to expand the range of experimentally available autocatalytic systems. Indeed, evolution requires heritable states that each relies on a different autocatalytic system.¹¹ At the moment, it has been shown that autocatalysis can be realized in various chemistries and the number of examples is expanding.¹⁶⁸ However, we lack experimental systems which possess multiple autocatalytic reactions in a same set of conditions. The conditions for network autocatalysis have been posed theoretically only recently,⁶⁵ which paves the way for a systematic search for autocatalytic networks. This could be done by data mining techniques in reaction databases.¹⁶¹ In the context of RNA, it is now experimentally feasible to characterize neutral sequence spaces of catalytic activities.¹³⁴ Finally, as we have seen in the last section, new analytical approaches make possible the search for emergent autocatalysis in complex mixtures.

2) The next question is to determine conditions for the viability of autocatalytic systems. In the case of template-based replication, viability is determined by the error threshold. More generally, every autocatalytic system has a viability threshold which poses conditions on its relationship with the environment,^{67,169} its kinetic^{65,167} and thermodynamic properties.¹⁷⁰

3) Finally, implementing and combining evolutionary properties in a Darwinian or non-Darwinian manner remains a fully open challenge. In particular, there is still no proof-of-concept of evolution in an experimental system, even between only two heritable states. A more exhaustive theory of evolutionary modes together with their associated reaction schemes would greatly expand the range of accessible experimental designs. The latest studies on autocatalytic network notably reveal that combining evolutionary properties is not obvious, as for instance variation, heredity and selection must be well balanced.^{10,171}

With these elements at hand, we should be able to deduce general principles for the emergence of evolution and assemble origin of life scenarios that can be assessed experimentally.⁹

References

- 1 C. Malaterre, in *Vitalism and the Scientific Image in Post-Enlightenment Life Science, 1800-2010*, eds. S. Normandin and C. T. Wolfe, Springer, Dordrecht, Heidelberg, New-York, London, 2013, pp. 155–178.
- 2 S. L. Miller, *Science*, 1953, **117**, 528–529.
- 3 R. Solé, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, , DOI:10.1098/rstb.2015.0438.
- 4 R. C. Lewontin, *Novartis Found. Symp.*, 1970, **213**, 1–19.
- 5 H. Mutschler, A. Wochner and P. Holliger, *Nat. Chem.*, 2015, **7**, 502–508.
- 6 D. Segre, D. Ben-Eli and D. Lancet, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, **97**, 4112–4117.
- 7 J. Oro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1960, **2**, 407–412.
- 8 A. Butlerov, *Ann. Chemie*, 1861, **120**, 295–298.
- 9 C. Jeancolas, C. Malaterre and P. Nghe, *iScience*, 2020, **23**, 101756.
- 10 V. Vasas, E. Szathmáry and M. Santos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 1470–1475.
- 11 V. Vasas, C. Fernando, M. Santos, S. Kauffman and E. Szathmáry, *Biol. Direct*, 2012, **7**, 1.
- 12 G. Von Kiedrowski, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 1986, **25**, 932–935.
- 13 G. Von Kiedrowski, B. Wlotzk, J. Helbing, M. Matzen and S. Jordan, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 1991, **30**, 423–426.
- 14 G. Von Kiedrowski, in *Bioorganic Chemistry Frontiers*, 1993, vol. 3, pp. 113–146.
- 15 A. Luther, R. Brandsch and G. Von Kiedrowski, *Nature*, 1998, **396**, 245–248.

- 16 T. A. Lincoln and G. F. Joyce, *Science*, 2009, **323**, 1229–1232.
- 17 R. Issac and J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 6808–6809.
- 18 X. Li and J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 11820–11821.
- 19 L. E. Orgel and W. S. Zielinski, *Nature*, 1987, **327**, 346–347.
- 20 T. A. Plöger and G. Von Kiedrowski, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 6908–6914.
- 21 N. Paul and G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 12733–40.
- 22 J. Rogers and G. F. Joyce, *RNA*, 2001, **7**, 395–404.
- 23 E. H. Ekland, J. W. Szostak and D. P. Bartel, *Science*, 1995, **269**, 364–370.
- 24 D.-E. Kim and G. F. Joyce, *Chem. Biol.*, 2004, **11**, 1505–1512.
- 25 D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin and M. R. Ghadiri, *Nature*, 1996, **382**, 525–528.
- 26 P. E. Dawson, T. W. Muir, L. Clark-Lewis and S. B. H. Kent, *Science*, 1994, **266**, 776–779.
- 27 D. H. Lee, K. Severin, Y. Yokobayashi and M. R. Ghadiri, *Nature*, 1997, **390**, 591–594.
- 28 G. Ashkenasy, R. Jagasia, M. Yadav and M. R. Ghadiri, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 10872–10877.
- 29 Z. Dadon, M. Samiappan, E. Y. Safranchik and G. Ashkenasy, *Chem. - A Eur. J.*, 2010, **16**, 12096–12099.
- 30 Z. Dadon, M. Samiappan, A. Shahar, R. Zarivach and G. Ashkenasy, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2013, **52**, 9944–9947.
- 31 R. Mukherjee, R. Cohen-Luria, N. Wagner and G. Ashkenasy, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2015, **54**, 12452–12456.
- 32 I. Maity, N. Wagner, R. Mukherjee, D. Dev, E. Peacock-Lopez, R. Cohen-Luria and G. Ashkenasy, *Nat. Commun.*, 2019, **10**, 1–9.
- 33 N. Wagner, R. Mukherjee, I. Maity, S. Kraun and G. Ashkenasy, *ChemSystemsChem*, 2020, **2**, 1–8.
- 34 S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi and J. Chmielewski, *Nature*, 1998, **396**, 447–450.
- 35 S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi and J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 8132.
- 36 S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi and J. Chmielewski, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 1998, **37**, 478–481.
- 37 M. Eigen, *Naturwissenschaften*, 1971, **58**, 465–523.
- 38 Y. Bansho, T. Furubayashi, N. Ichihashi and T. Yomo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016, **113**, 4045–4050.

- 39 T. Furubayashi, K. Ueda, Y. Bansho, D. Motooka, S. Nakamura, R. Mizuuchi and N. Ichihashi, *Elife*, 2020, **9**, 1–15.
- 40 L. K. L. Cheng and P. J. Unrau, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2010, **2**, a002204.
- 41 B. Obermayer and E. Frey, *Europhys. Lett.*, , DOI:10.1209/0295-5075/88/48006.
- 42 S. Matsumura, Á. Kun, M. Ryckelynck, F. Coldren, A. Szilágyi, F. Jossinet, C. Rick, P. Nghe, E. Szathmáry, A. D. Griffiths and A. Bhq-, *Science*, 2016, **354**, 1293–1296.
- 43 A. Blokhuis, P. Nghe, L. Peliti and D. Lacoste, *J. Theor. Biol.*, 2020, **487**, 110110.
- 44 E. Szathmáry, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 2006, **361**, 1761–1776.
- 45 Á. Kun, M. Santos and E. Szathmáry, *Nat. Genet.*, 2005, **37**, 1008–1011.
- 46 M. D. Been and T. R. Cech, *Science*, 1988, **239**, 1412–1416.
- 47 R. Green and J. W. Szostak, *Science*, 1992, **258**, 1910–1915.
- 48 J. A. Doudna and J. W. Szostak, *Nature*, 1989, **339**, 519–522.
- 49 J. W. Szostak and D. P. Bartel, *Science*, 1993, **261**, 1411.
- 50 E. H. Eklund and D. P. Bartel, *Nature*, 1996, **382**, 373–376.
- 51 W. K. Johnston, P. J. Unrau, M. S. Lawrence, M. E. Glasner and D. P. Bartel, *Science*, 2001, **292**, 1319–1325.
- 52 D. M. Shechner, R. A. Grant, S. C. Bagby, Y. Koldobskaya, J. A. Piccirilli and D. P. Bartel, *Science*, 2009, **326**, 1271–1275.
- 53 A. Wochner, J. Attwater, A. Coulson and P. Holliger, *Science*, 2011, **332**, 209–212.
- 54 J. Attwater, A. Wochner and P. Holliger, *Nat. Chem.*, 2013, **5**, 1011–1018.
- 55 D. P. Horning and G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, **113**, 9786–9791.
- 56 J. Attwater, A. Raguram, A. S. Morgunov, E. Gianni and P. Holliger, *Elife*, 2018, **7**, 1–25.
- 57 K. F. Tjhung, M. N. Shokhirev, D. P. Horning and G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2020, **117**, 2906–2913.
- 58 J. W. Szostak, *J. Syst. Chem.*, 2012, **3**, 1–14.
- 59 I. A. Kozlov and L. E. Orgel, *Mol. Biol.*, 2000, **34**, 781–789.
- 60 T. Walton, W. Zhang, L. Li, C. P. Tam and J. W. Szostak, *Angew. Chemie*, 2019, **131**, 10926–10933.
- 61 J. W. Szostak, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, **56**, 11037–11043.
- 62 C. Deck, M. Jauker and C. Richert, *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 603–608.
- 63 N. Prywes, J. C. Blain, F. Del Frate and J. W. Szostak, *Elife*, 2016, **5**, e17756.

- 64 L. Zhou, D. K. O’Flaherty and J. W. Szostak, *Angew. Chemie*, 2020, **132**, 15812– 15817.
- 65 A. Blokhuis, D. Lacoste and P. Nghe, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, , DOI:10.1073/pnas.2013527117.
- 66 S. A. Kauffman, *J. Theor. Biol.*, 1986, **119**, 1–24.
- 67 R. J. Bagley, J. D. Farmer and W. Fontana, in *Artificial Life II*, eds. C. G. Langton, C. Taylor, J. D. Farmer and S. Rasmussen, Addison-Wesley, Santa Fe, 1991, pp. 141–158.
- 68 E. Szathmáry, *J. Syst. Chem.*, 2013, **4**, 2–5.
- 69 P. Nghe, W. Hordijk, S. A. Kauffman, S. I. Walker, F. J. Schmidt, H. Kemble, J. A. M. Yeates and N. Lehman, *Mol. Biosyst.*, 2015, **11**, 3206–3217.
- 70 P. Erdos and A. Rényi, *Math Inst. Hung. Acad. Sci.*, 1960, **9781400841**, 38–82.
- 71 S. Lifson, *J. Mol. Evol.*, 1997, **44**, 1–8.
- 72 W. Hordijk and M. Steel, *J. Math. Chem.*, 2016, **54**, 1997–2021.
- 73 W. Hordijk and M. Steel, *J. Theor. Biol.*, 2004, **227**, 451–461.
- 74 E. J. Hayden, G. Von Kiedrowski and N. Lehman, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2008, **47**, 8424–8428.
- 75 J. A. M. Yeates, C. Hilbe, M. Zwick, M. A. Nowak and N. Lehman, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, **113**, 5030–5035.
- 76 J. A. M. Yeates, P. Nghe and N. Lehman, *RNA*, 2017, **23**, 1088–1096.
- 77 W. Hordijk and M. Steel, *Orig. Life Evol. Biosph.*, 2014, **44**, 111–124.
- 78 V. Giri and S. Jain, *PLoS One*, , DOI:10.1371/journal.pone.0029546.
- 79 D. Lancet, R. Zidovetzki and O. Markovitch, *J. R. Soc. Interface*, , DOI:10.1098/rsif.2018.0159.
- 80 B. Kettlewell, *The evolution of melanism: the study of a recurring necessity*, Clarendon Press, Oxford, 1973.
- 81 K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling and T. R. Cech, *Cell*, 1982, **31**, 147–157.
- 82 F. Wachowius, J. Attwater and P. Holliger, *Q. Rev. Biophys.*, , DOI:10.1017/s0033583517000038.
- 83 M. P. Robertson and G. F. Joyce, *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, 2012, **4**, a003608.
- 84 L. K. L. Cheng and P. J. Unrau, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2010, **2**, a002204.
- 85 N. Vaidya, M. L. Manapat, I. A. Chen, R. Xulvi-Brunet, E. J. Hayden and N. Lehman, *Nature*, 2012, **491**, 72–77.

- 86 Y. Zhou, C. Lu, Q. J. Wu, Y. Wang, Z. T. Sun, J. C. Deng and Y. Zhang, *Nucleic Acids Res.*, 2008, **36**, 31–37.
- 87 C. Jeancolas, Y. J. Matsubara, M. Vybornyi, C. N. Lambert, A. Blokhuis, T. Alline, A. D. Griffiths, S. Ameta, S. Krishna and P. Nghe, *Chem. Commun.*, , DOI:10.1039/d1cc02290c.
- 88 A. J. Zaug, M. M. McEvoy and T. R. Cech, *Biochemistry*, 1993, **32**, 7946–7953.
- 89 N. Vaidya, S. I. Walker and N. Lehman, *Chem. Biol.*, 2013, **20**, 241–252.
- 90 A. J. Hager, J. D. Pollard and J. W. Szostak, *Chem. Biol.*, 1996, **3**, 717–725.
- 91 P. L. Adams, M. R. Stahley, M. L. Gill, A. B. Kosek, J. Wang and S. A. Strobel, *Nature*, 2004, **430**, 45–50.
- 92 A. J. Zaug and T. R. Cech, *Science*, 1986, **231**, 470–475.
- 93 T. R. Cech, *Angew. Chemie Int. Ed. English*, 1990, **29**, 759–768.
- 94 F. L. Murphy and T. R. Cech, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1989, **86**, 9218–9222.
- 95 C. H. Lee, S. R. Han and S. W. Lee, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2018, **9**, 1–16.
- 96 B. A. Sullenger and T. R. Cech, *Nature*, 1994, **371**, 619–622.
- 97 W. E. Draper, E. J. Hayden and N. Lehman, *Nucleic Acids Res.*, 2008, **36**, 520–531.
- 98 A. J. Zaug, M. D. Been and T. R. Cech, *Nature*, 1986, **324**, 429–433.
- 99 B. M. Chowrira, A. Berzal-Herranz and J. M. Burke, *EMBO J.*, 1993, **12**, 3599–3605.
- 100 G. F. Dolan and U. F. Müller, *RNA*, 2014, **20**, 202–213.
- 101 C. . Riley and N. Lehman, *Chem. Biol.*, 2003, **9**, 18133–18141.
- 102 E. Hayden, C. Riley, A. Burton and N. Lehman, *RNA*, 2005, **11**, 1678–1687.
- 103 C. Jeancolas, Y. J. Matsubara, M. Vybornyi, C. N. Lambert, A. Blokhuis, T. Alline, S. Ameta, S. Krishna and A. D. Griffiths, *Chem. Commun.*, 2021.
- 104 F. Michel and E. Westhof, *J. Mol. Biol.*, 1990, **216**, 585–610.
- 105 F. Michel, A. D. Ellington, S. Couture and J. W. Szostak, *Nature*, 1990, **347**, 578–580.
- 106 T. Inoue, Y. Ikawa and H. Shiraishi, *Nat. Struct. Biol.*, 2000, **7**, 1032–1035.
- 107 Q. Vicens and T. R. Cech, *Trends Biochem. Sci.*, 2006, **31**, 41–51.
- 108 K. N. Tanner and B. Sargueil, *J. Mol. Biol.*, 1995, **252**, 583–595.
- 109 S. A. Woodson, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2005, **15**, 324–330.
- 110 F. Guo, A. R. Gooding and T. R. Cech, *Mol. Cell*, , DOI:10.1016/j.molcel.2004.10.003.
- 111 P. L. Adams, M. R. Stahley, A. B. Kosek, J. Wang and S. A. Strobel, *Nature*, 2004, **430**, 45–50.

- 112 B. L. Golden, H. Kim and E. Chase, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2005, **12**, 82–89.
- 113 G. Van Der Horst, A. Christian and T. Inoue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1991, **88**, 184–188.
- 114 J. A. Doudna and T. R. Cech, *RNA*, 1996, 36–45.
- 115 J. A. Doudna and J. W. Szostak, *Nature*, 1989, **339**, 519–522.
- 116 J. A. Doudna, S. Couture and J. W. Szostak, *Science*, 1991, **251**, 1605–1608.
- 117 S. J. Ohuchi, Y. Ikawa, H. Shiraishi and T. Inoue, *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**, 3473–3480.
- 118 Y. Ikawa, W. Yoshioka, Y. Ohki, H. Shiraishi and T. Inoue, *Genes to Cells*, 2001, **6**, 411–420.
- 119 M. A. Tanner and T. R. Cech, *Science*, 1997, **275**, 847–849.
- 120 P. L. ADAMS, *RNA*, 2004, **10**, 1867–1887.
- 121 B. L. Golden, H. Kim and E. Chase, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2005, **12**, 82–89.
- 122 P. L. Adams, M. R. Stahley, A. B. Kosek, J. Wang and S. A. Strobel, *Nature*, 2004, **430**, 45–50.
- 123 J. M. Burke, M. Belfort, T. R. Cech, R. W. Davies, R. J. Schweyen, D. A. Shub, J. W. Szostak and H. F. Tabak, *Nucleic Acids Res.*, 1987, **15**, 7217–7221.
- 124 F. L. Murphy and T. R. Cech, *J. Mol. Biol.*, 1994, **236**, 49–63.
- 125 S. A. Strobel, L. Ortoleva-Donnelly, S. P. Ryder, J. H. Gate and E. Moncoeur, *Nat. Struct. Biol.*, 1998, **5**, 60–66.
- 126 S. A. Strobel, *Biochem. Soc. Trans.*, 2002, **30**, 1126–1131.
- 127 G. Hausner, M. Hafez and D. R. Edgell, *Mob. DNA*, 2014, **5**, 1–12.
- 128 J. W. Szostak and D. P. Bartel, *Science*, 1993, **261**, 1411.
- 129 J. Attwater, A. Raguram, A. S. Morgunov, E. Gianni and P. Holliger, *Elife*, 2018, **7**, 1–25.
- 130 D. P. Horning and G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016, **113**, 9786–9791.
- 131 E. J. Hayden and N. Lehman, *Chem. Biol.*, 2006, **13**, 909–918.
- 132 T. S. Jayathilaka and N. Lehman, *ChemBioChem*, 2018, **19**, 217–220.
- 133 E. J. Hayden, D. P. Bendixsen and A. Wagner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015, **112**, 12444–9.
- 134 E. J. Hayden, E. Ferrada and A. Wagner, *Nature*, 2011, **474**, 92–95.
- 135 J. A. M. Yeates, C. Hilbe, M. Zwick, M. A. Nowak and N. Lehman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016, **113**, 5030–5.

- 136 J. A. M. Yeates, P. Nghe and N. Lehman, *RNA*, 2017, **23**, 1088–1096.
- 137 S. Ameta, S. Arsène, S. Foulon, B. Saudemont and B. E. Clifton, <http://dx.doi.org/10.1101/726497>, 2019, 1–41.
- 138 S. Arsène, S. Ameta, N. Lehman, A. D. Griffiths and P. Nghe, *Nucleic Acids Res.*, 2018, **46**, 9660–9666.
- 139 H. N. Miras, C. Mathis, W. Xuan, D. L. Long, R. Pow and L. Cronin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2020, **117**, 10699–10705.
- 140 D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin and M. R. Ghadiri, 1996, **382**, 525–528.
- 141 J. M. A. Carnall, C. A. Waudby, A. M. Belenguer, M. C. A. Stuart, J. J. P. Peyralans and S. Otto, *Science*, 2010, **327**, 1502–1506.
- 142 J. W. Sadownik, E. Mattia, P. Nowak and S. Otto, *Nat. Chem.*, 2016, **8**, 264–269.
- 143 I. Maity, N. Wagner, R. Mukherjee, D. Dev, E. Peacock-Lopez, R. Cohen-Luria and G. Ashkenasy, *Nat. Commun.*, 2019, **10**, 1–9.
- 144 J. L. Bada and A. Lazcano, *Science*, 2003, **300**, 745–746.
- 145 J. Oro, *Nature*, 1961, **191**, 1193–1194.
- 146 T. Zweckmair, S. Bo, A. Bogolitsyna, T. Rosenau, A. Potthast and S. Novalin, *J. Chromatogr. Sci.*, 2014, **52**, 169–175.
- 147 T. M. Mccollom, G. Ritter and B. R. T. Simoneit, *Orig. Life Evol. Biosph.*, 1999, **29**, 153–166.
- 148 S. A. Benner, *Orig. Life Evol. Biosph.*, 2014, **44**, 339–343.
- 149 C. Mariscal, A. Barahona, N. Aubert-Kato, A. U. Aydinoglu, S. Bartlett, M. L. Cárdenas, K. Chandru, C. Cleland, B. T. Cocanougher, N. Comfort, A. CornishBowden, T. Deacon, T. Froese, D. Giovannelli, J. Hernlund, P. Hut, J. Kimura, M. C. Maurel, N. Merino, A. Moreno, M. Nakagawa, J. Peretó, N. Virgo, O. Witkowski and H. James Cleaves, *Orig. Life Evol. Biosph.*, 2019, **49**, 111–145.
- 150 A. W. Schwartz, *Chem. Biodivers.*, 2007, **4**, 656–664.
- 151 S. Islam and M. W. Powner, *Chem*, 2017, **2**, 470–501.
- 152 S. Colón-Santos, G. J. T. Cooper and L. Cronin, *ChemSystemsChem*, 2019, **1**, 2–6.
- 153 A. J. Surman, M. Rodriguez-Garcia, Y. M. Abul-Haija, G. J. T. Cooper, P. S. Gromski, R. Turk-MacLeoda, M. Mullin, C. Mathis, S. I. Walker and L. Cronin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2019, **116**, 5387–5392.
- 154 S. Scherer, E. Wollrab, L. Codutti, T. Carlomagno, S. G. da Costa, A. Volkmer, A. Bronja, O. J. Schmitz and A. Ott, *Orig. Life Evol. Biosph.*, 2017, **47**, 381–403.

- 155 H. Mutschler, A. I. Taylor, B. T. Porebski, A. Lightowers, G. Houlihan, M. Abramov, P. Herdewijn and P. Holliger, *Elife*, 2018, **7**, 1–26.
- 156 N. Guttenberg, N. Virgo, K. Chandru, C. Scharf and I. Mamajanov, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, 2017, **375**, 20160347.
- 157 L. Vincent, M. Berg, M. Krismer, S. S. Saghafi, J. Cosby, T. Sankari, K. Vetsigian, H. J. Cleaves and D. A. Baum, *Life*, , DOI:10.3390/life9040080.
- 158 G. Wächtershäuser, *Microbiol. Rev.*, 1988, **52**, 452–484.
- 159 J. Ortega-Arroyo, A. J. Bissette, P. Kukura and S. P. Fletcher, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, **113**, 11122–11126.
- 160 S. Szymkuć, E. P. Gajewska, T. Klucznik, K. Molga, P. Dittwald, M. Startek, M. Bajczyk and B. A. Grzybowski, *Computer-Assisted Synthetic Planning: The End of the Beginning*, 2016, vol. 55.
- 161 A. Wołos, R. Roszak, A. Żądło-Dobrowolska, W. Beker, B. Mikulak-Klucznik, G. Spólnik, M. Dygas, S. Szymkuć and B. A. Grzybowski, *Science*, , DOI:10.1126/SCIENCE.AAW1955.
- 162 S. Asche, G. J. T. Cooper, G. Keenan, C. Mathis and L. Cronin, *Nat. Commun.*, 2021, **12**, 1–9.
- 163 J. L. King and T. H. Jukes, *Science*, 1969, **164**, 788–798.
- 164 A. Blokhuis, D. Lacoste, P. Nghe and L. Peliti, *Phys. Rev. Lett.*, 2018, **120**, 158101.
- 165 G. Danger, L. L. S. D’Hendecourt and R. Pascal, *Nat. Rev. Chem.*, 2020, **4**, 102–109.
- 166 Y. Liu, *Biol. Direct*, 2020, **15**, 1–16.
- 167 G. A. M. King, *BioSystems*, 1982, **15**, 89–97.
- 168 A. I. Hanopolskyi, V. A. Smaliak, A. I. Novichkov and S. N. Semenov, *ChemSystemsChem*, , DOI:10.1002/syst.202000026.
- 169 J. L. Andersen, C. Flamm, D. Merkle and P. F. Stadler, *Mol. Syst. Biol.*, 2020, **16**, e9110.
- 170 R. Rao and M. Esposito, *Phys. Rev. X*, 2016, **6**, 1–23.
- 171 S. Ameta, S. Arsène, S. Foulon, B. Saudemont, B. E. Clifton, A. D. Griffiths and P. Nghe, *Nat. Commun.*, 2021, **12**, 842.

5.2. RNA diversification by a self-reproducing ribozyme revealed by deep sequencing and kinetic modelling

5.2.1 Main text

We demonstrate that a recombinase ribozyme achieves multiple functions in the same reaction network: self-reproduction, iterative elongation, and circularization of other RNAs, leading to synthesis of diverse products predicted by a kinetic model. This shows that key mechanisms can be integrated and controlled toward Darwinian evolution in RNA reaction networks.

The “RNA world” hypothesis surmises RNA as a primordial biopolymer capable of evolution due to its ability to store information and catalyze reactions.¹ An RNA polymerase ribozyme that catalyzes its own copy and the copy of other RNAs would support this hypothesis but has not yet been found.² Alternatively, ribozymes can make copies of themselves from fragments via energy-rich³ or energy-neutral⁴ chemistries. Autocatalytic reproduction has been engineered using the ~200 nt long *Azoarcus* group I intron ribozyme via recombination reactions between hybridized RNA fragments.^{5,6} Such catalysis requires the binding of a 3 nt long internal guide sequence (IGS) of the ribozyme to a 3 nt long ‘tag’ sequence of the substrates.⁷ Different IGStag combinations result in autocatalytic sets that differ in their dynamics and ability to reproduce.⁵ However, open-ended evolution further requires self-reproducing RNAs to generate novel sequences. Group I intron ribozymes are promising candidates^{8,9,10} for sequence diversification as they catalyze the recombination of other RNAs in addition to their own reproduction.

Here, we characterize sequence variation occurring through the combination of two mechanisms catalyzed by the self-reproducing *Azoarcus* ribozyme. A first mechanism, here called *repeated transfer* (RT), allows covalent additions of multiple RNA fragments to the 3’ end of an RNA substrate (**RNA1, Figure 1**), leading to RNA elongation from 26 nt to at least 136 nt. A second mechanism, here called *terminal strand attack* (TSA), results in the ligation of hybridized RNAs (**RNA2, Figure 1**) into hairpin and circular products. RT and TSA can be combined (**RNA3, Figure 1**), leading to diversification of the RNA products together with ribozyme self-reproduction. For further mechanistic details, see Supplementary Informations. Furthermore, the reaction network dynamics parameterized from gel data can be integrated in a kinetic model that predicts species distributions revealed by sequencing (Supplementary Informations).

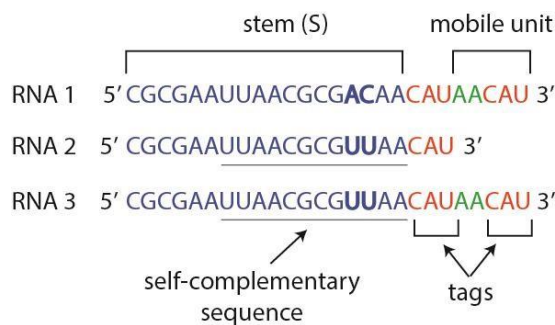


Figure 1 RNA substrates are composed of a “stem” (blue) and a tag (red). **RNA1** stem differs from **RNA2** and **RNA3** stems by two nucleotides (bold). **RNA2** and **RNA3** have a selfcomplementary sequence (underlined), which can hybridize in experimental conditions, whereas **RNA1** does not. **RNA1** and **RNA3** have a “mobile unit” after the first tag which can be polymerized by the *Azoarcus* ribozyme.

First, we show that **RNA1** is elongated by multiple additions of small fragments in the presence of the ribozyme. **RNA1** is composed of an 18 nt “stem” (S), a 3 nt tag, and a 5 nt “mobile unit” (**Figure 1**). We observe a variety of products denoted S_n , which length corresponds to the addition of n mobile units appended to the stem. Polyacrylamide gel images reveal four bands (**Figure 2a**) after 1 hour of reaction, corresponding to S_0 (21 nt), S_1 (26 nt), S_2 (31 nt) and S_3 (36 nt). The concentrations of putative S_0 , S_1 and S_2 species were measured over 7 h by gel electrophoresis, showing the transient formation of S_2 during the first 4 h (**Figure 2b**). Sequencing after 45 min of incubation confirmed that RNA sequences result from iterative additions of mobile units (**Figure 2c**, see **Figure S2** for all S_n species detected, Supplementary Informations). Such additions can be explained by formerly identified reactions catalyzed by the *Azoarcus* ribozyme,⁷ here performed in 2 steps: first forward, then reverse after substrate exchange (**Figure 2d**, see Supplementary Informations for details). Concentrations could be quantified by sequencing up to S_7 , and up to S_{23} sequences were detected (**Figure S2**). S_n concentration decreases exponentially with n (**Figure 2c**) consistent with earlier theoretical predictions.¹¹ We devised a kinetic model comprising the transfer reactions $S_n + S_m \rightarrow S_{n+p} + S_{m-p}$, using the same rate k for all n , m and p , $p \leq m$, and the degradation rates of stems and of mobile units (see “Model for RT” in Supplementary Informations). These 3 parameters were fitted using S_0 , S_1 and S_2 concentration at 0, 1, 3, 5 and 7 h from PAGE analysis (Supplementary Informations, **Figure 2b**). The model reproduced the concentration time courses: S_1 concentration decreases rapidly, S_2 concentration reaches a maximum at around 45 min and decreases after 3 h of reaction, and S_0 concentration increases until reaching a plateau after 3 h and subsequently slowly decreases. Without further fitting, the model predicted an exponential decrease of product frequencies as a function of their length at 45 min of reaction, as observed experimentally (**Figure 2c**). From S_1 to S_7 , the measured and predicted decay factor $\ln(S_n/S_{n+1})$, with s_n being the fraction of S_n , agree quantitatively (-1.569 ± 0.057 and -1.589 , respectively), with a correlation $R^2=0.988$ ($p < 10^{-5}$) between measured and predicted frequencies (**Figure S3**, Supplementary Informations).

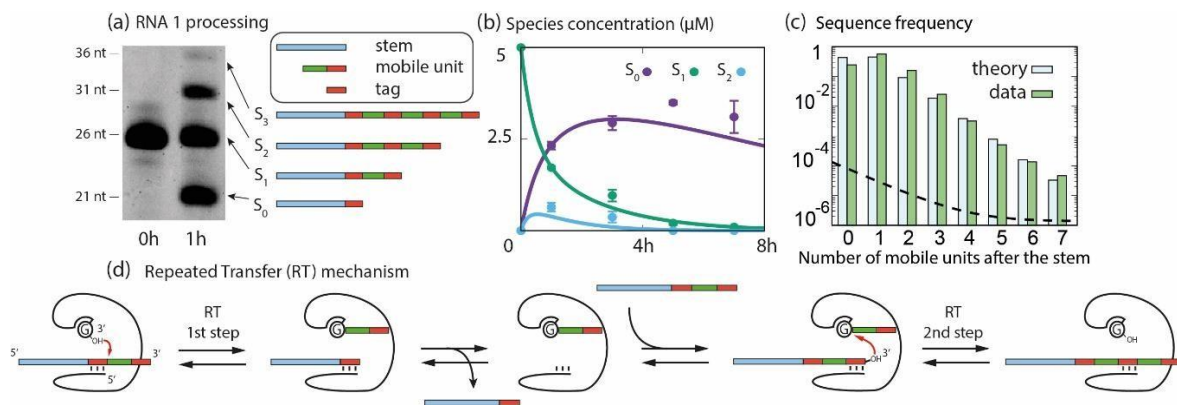


Figure 2. Ribozyme-based RNA elongation by RT. **(a)** Gel image showing the length diversity of products after 1 h of reaction (**RNA1** with *Azoarcus* ribozyme). **(b)** Evolution of the concentrations of **RNA1** (S_1), products without a mobile unit (S_0), and products with two mobile units (S_2): experimental values from gel band intensities (dots) and kinetic model predictions (solid lines). Error bars are standard deviations from triplicates. **(c)** Fraction of products versus number of mobile units, after 45 min of reaction: RNA sequencing data (green bars) and kinetic model (blue bars, Supplementary Informations†) fitted to gel electrophoresis data. The sequencing data is calibrated for length biases due to sequencing library preparation (see **Figure S1**). The dashed horizontal line indicates the calibrated limit of detection (Materials and Methods, Supplementary Informations†). **(d)** Schematic of the RT mechanism accounting for the elongation of **RNA1**.

Next, we show that **RNA2** undergoes catalytic dimerization and circularization in the presence of the ribozyme via the TSA mechanism. **RNA2** is composed of an 18 nt long stem (S) with a 12 nt self-complementary region and a 3 nt tag (**Figure 1**). Over 22 h, polyacrylamide gels (PAGE) indicate the transient formation of almost twice longer RNAs and the appearance of lower bands assigned to circular RNAs (**Figure 3a**). The formation of hairpins (H) was confirmed by sequencing and of circular RNA (C) by differential mobility assays with 12 % and 18 % polyacrylamide gels¹² (**Figure S4**, Supplementary Informations). Hairpins and cyclic RNAs result from the hybridization of two **RNA2** molecules via their self-complementary region and by the ribozyme catalyzed TSA reaction, enabled by the presence of 3' tags (**Figure 3c**, see Supplementary Informations for details). We devised a kinetic model of the two TSA reactions $S + S \rightarrow H$ and $H \rightarrow C$ with rate constants k_1 and k_2 . We fitted these 2 parameters to the concentration of S , H and C at 0, 1, 3, 5 and 7 h of reaction from PAGE gel data. Theoretical and experimental concentration time courses of the three species agree over 7 h of reaction (**Figure 3b**): S is roughly halved in the first hour, then decreases more slowly, H increases to a maximum after 2 h and then decreases to reach the same concentration as S , while C continuously increases during the 7 h of reaction.

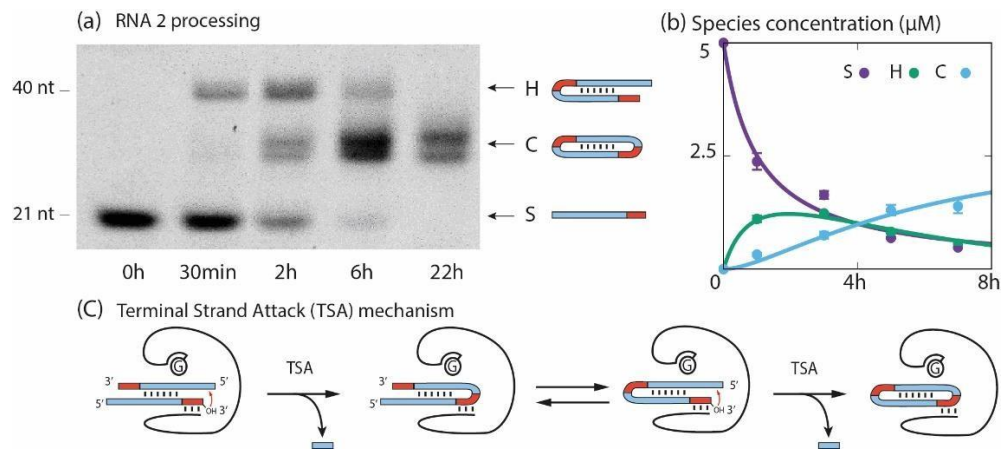


Figure 3. Dimerization and circularization by TSA. **(a)** Gel image showing the successive production of hairpins and circular RNAs starting from **RNA2**. Double bands are due to two sites for transesterification as confirmed in sequencing data. **(b)** Concentration evolution of **RNA2** (S), hairpin (H), and circular products (C): experimental values from the band intensities (dots) and concentrations predicted by the model (solid lines). **(c)** Schematic of the TSA mechanism applied to **RNA2**.

Thereafter, we show the combination of ribozyme catalyzed elongation, dimerization, and circularization using **RNA3** as a substrate. **RNA3** combines **RNA2** self-complementary stem with **RNA1** mobile unit (**Figure 1**), thus can undergo both RT and TSA. Over 22 h, species S_0 and S_2 were produced transiently along with hairpin RNAs, followed by the production of circular RNAs (**Figure 4a**) confirmed by RNA sequencing and gel mobility assay (**Figure S4**, Supplementary Informations). Sequencing revealed a diversity of RNAs after 45 min: $H_{m,n}$, standing for hairpin (H) products with m and n mobile units after the first and the second stems, respectively (**Figure 4b**, see **Figure S2** for all S_n species detected, Supplementary Informations). The 5 parameters of the combined models described above for **RNA1** and **RNA2** were fitted (**Table S2**) to the concentration of S_0 , S_1 , S_2 and H (the sum of all $H_{m,n}$) measured on gel over 7 h of reaction starting with **RNA3** (**Figure S5**, Supplementary Informations). The model was parameterized only with the gel data, which allowed quantification of circular RNAs absent from the sequencing data. The predicted proportions of S_n (with $0 \leq n \leq 5$) and $H_{m,n}$ (with $0 \leq m, n \leq 3$) at 45 min reproduce the trends of each category of products (separated by horizontal dotted lines in **Figure 4b**). Like for **RNA1**, S_n species decrease exponentially with their size, the measured and predicted decay factor being -1.74 ± 0.09 and -1.65 , respectively. This trend is conserved with $H_{m,n}$ species: at a given m (from 0 to 3), $H_{m,n}$ species also decrease exponentially with n (from 1 to 3) with a similar exponential decay factor as S_n species (see “Model for RT+TSA” in Supplementary Informations). The correlation factor between measured and predicted frequencies is $R^2=0.940$ ($p < 10^{-5}$, **Figure S3**, Supplementary Informations).

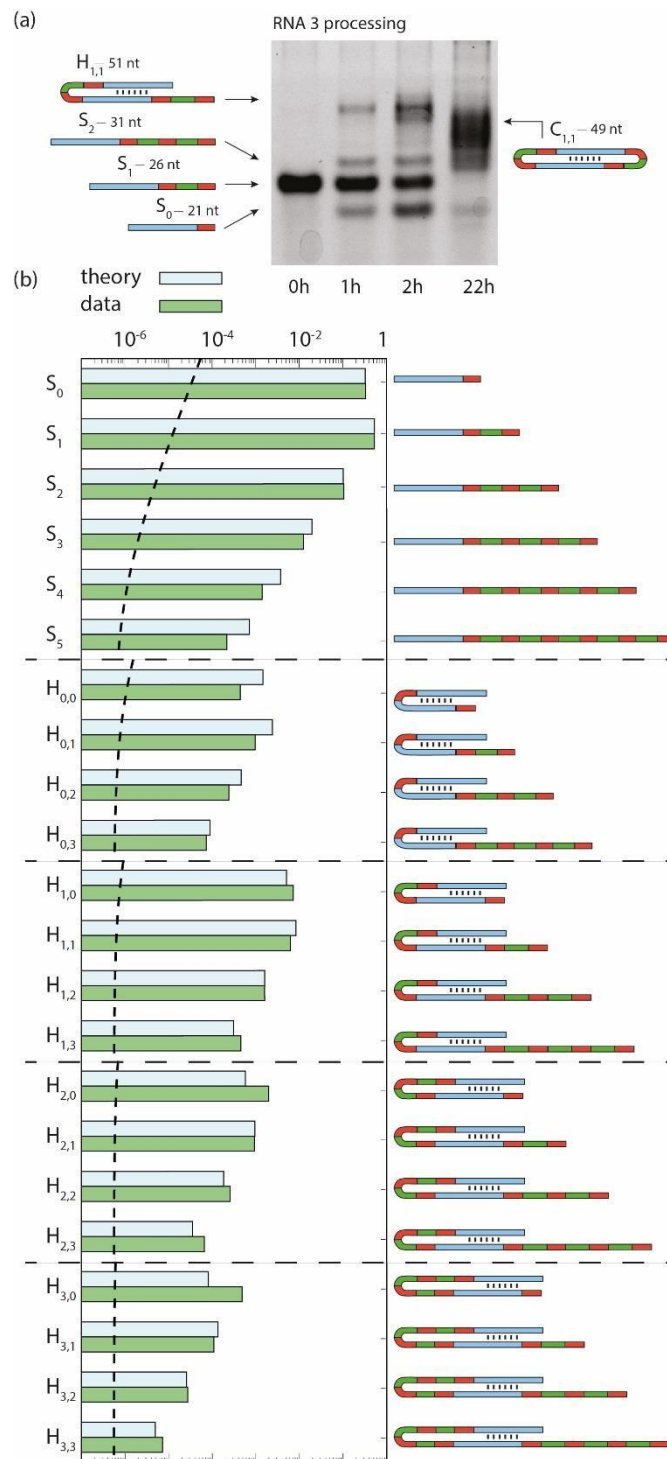


Figure 4 Combination of RT and TSA reactions. **(a)** Gel image showing the bands corresponding to the addition of one mobile unit and hairpin formation (from **RNA3** substrate). At 22 h, diverse products longer than the substrate appear, among which hairpins and cyclic RNAs. **(b)** Relative proportion of expected products at 45 min measured by RNA sequencing compared to the predictions from the model, independently parameterized with gel data. Measured frequencies are calibrated for length biases (**Figure S1**, Supplementary Informations). The dashed horizontal line indicates the calibrated limit of detection (Materials and Methods, Supplementary Informations).

Finally, we show that the *Azoarcus* ribozyme (noted WXYZ, where the letters refer to 4 contiguous parts, **Figure S6** Supplementary Informations)⁴ self-reproduces from two fragments (WXY and Z) and simultaneously processes the **RNA3** substrate through RT and TSA (**Figure**

5a). We observed by PAGE the appearance of the band corresponding to the covalent *Azoarcus* ribozyme as well as those corresponding to the products of TSA and RT mechanisms on **RNA3** (mainly S_1 , S_2 and H) over 5 h of reaction (**Figure 5b**). As bands characteristic of cyclic RNA could not be confidently detected in the product smear, we confirmed separately the ability of a WXY and Z mixture to generate a cyclic RNA from **RNA2** (**Figure S7**, Supplementary Informations). The concentration dynamics of S_0 , S_1 , S_2 and H are well described by the same model as for **RNA3**, and the same fitting procedure results in slightly reduced parameter values, which reflects the inhibitory effect of free Z strands and the lower catalytic efficiency of the WXY:Z non-covalent complex⁵ (**Figure S8**, Supplementary Informations). The concentrations of WXY, Z and WXYZ were used to fit a set of kinetic equations for *Azoarcus* selfreproduction, comprising formation of the WXY:Z complex and covalent bond formation $WXY:Z \rightarrow WXYZ$ catalyzed by both WXY:Z and WXYZ.¹³ The kinetics show that recombination reactions involving **RNA3** reduce the yield of self-reproduction of only ~10% at 7 h, despite **RNA3** being initially 10 times more concentrated than ribozyme fragments (**Figure S9**, Supplementary Informations).

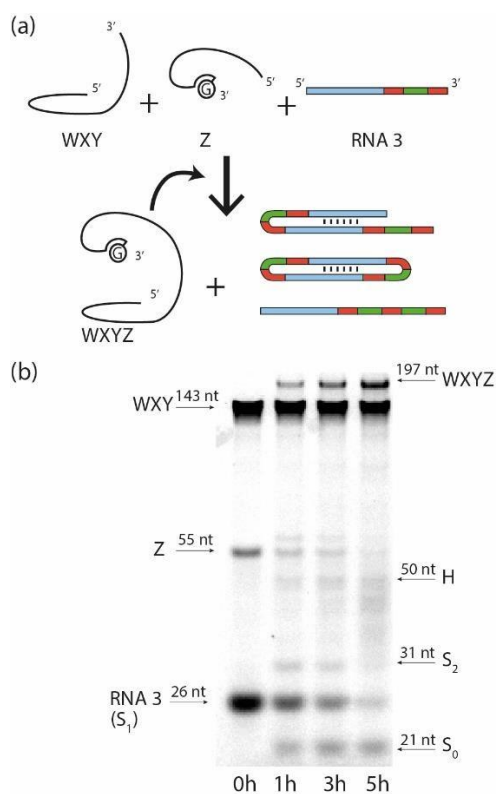


Figure 5. *Azoarcus* ribozyme self-reproduction and processing of **RNA3** in one pot. **(a)** Formation of WXYZ from WXY and Z fragments catalyzed by non-covalent (WXY:Z) and covalent (WXYZ) ribozymes, together with the formation of diversified RNA species through **RNA3** processing. **(b)** Gel showing the concomitant production of WXYZ through selfreproduction and the processing of RNA3 in one pot.

This study shows mechanisms for ribozyme-mediated RNA sequence diversification, hairpin formation, circularization, extension, self-reproduction, and their integration in reaction

networks. We have furthermore shown that the dynamics of these networks can be modeled quantitatively and that such a model predicts the diversity and concentration of products from the knowledge of substrate sequences. The ability of the *Azoarcus* ribozyme to catalyze its own formation from smaller fragments, diversify and elongate other fragments in an energy-neutral fashion is a notable advantage in the origin of life context. Furthermore, mechanisms for RNA elongation and structure formation are crucial to generate functional RNAs. Circularizing RNA could have been a way to store primordial genetic information,¹³ thus favoring heredity as in viroids,¹⁴ also of interest for the synthesis of cyclic siRNA for interfering therapies.¹⁵ This study overall paves the way to engineer evolvable RNA systems by combining mechanisms enabling reproduction, diversification, and structure formation.

5.2.2. Supplementary informations

5.2.2.i Mechanistic details

Mechanistic details for Repeated Transfer (RT)

See **Figure 2d** for a graphic representation of the reaction scheme. The succession of transesterifications involved in RT has been coined “R2F2” in the context of the *Azoarcus* ribozyme self-assembly.⁷ The two steps of the RT mechanism are reminiscent of the reverse and forward reactions of the second step of self-splicing in group I introns.^{7,16} In the first step, the IGS of the ribozyme binds to the 5'-most tag of **RNA1** and the 3'-OH of the ribozyme's 3'-guanosine attacks the phosphodiester bond immediately downstream of the 5'-most tag, the resulting transesterification reaction leading to the elongation of the ribozyme and cleavage of the substrate. Then, the elongated ribozyme can bind to the 3'-most tag of another **RNA1**, initiating the second step of the RT mechanism. The 3'-OH of **RNA1** attacks the phosphodiester bond between the ribozyme and the mobile unit, and the resulting transesterification reaction adds the mobile unit to the 3'-end of **RNA1**. Elongation by the RT reaction scheme is different from the elongations shown by Cech and coworkers.⁸⁻¹⁰ Indeed, the RT reaction does not oligomerize nor circularize the ribozyme itself (in *cis*),¹⁰ but other RNA fragments (in *trans*) which enables multiple turnovers. The RT reaction also neither requires sequence complementarity for the added nucleotides nor a guanosine leaving group,⁸ which enables indefinite recombinations. Finally, the RT reaction does not require strong sequence complementarity (such as 11 nt) between the ribozyme and the substrate, or a guanosine at the oligomer 3'-end, and does not require the oligomerization to happen at the 3'-end of the ribozyme itself.⁹ This means the RT reaction offers a very flexible way to oligomerize RNA sequences.

Mechanistic details for Terminal Strand Attack (TSA)

Based on prior mechanistic knowledge,⁷ we deduce that the 3'-OH of one substrate strand attacks a sterically proximal phosphodiester near the 5'-end of the other substrate strand, the transesterification reaction leading to formation of a hairpin structure. The ribozyme can also bind to the substrate at the 3'-tag of the newly formed hairpin, and circularizes it using the same mechanism. These trans-esterifications are reminiscent of the forward reaction of the second step of self-splicing in group I introns, and have been named “tF2” in the context of the *Azoarcus* ribozyme self-assembly.⁷ To our knowledge, no circularization of an RNA other than the ribozyme itself,¹⁷ has been shown through this mechanism.

5.2.2.ii Figures S1 to S9

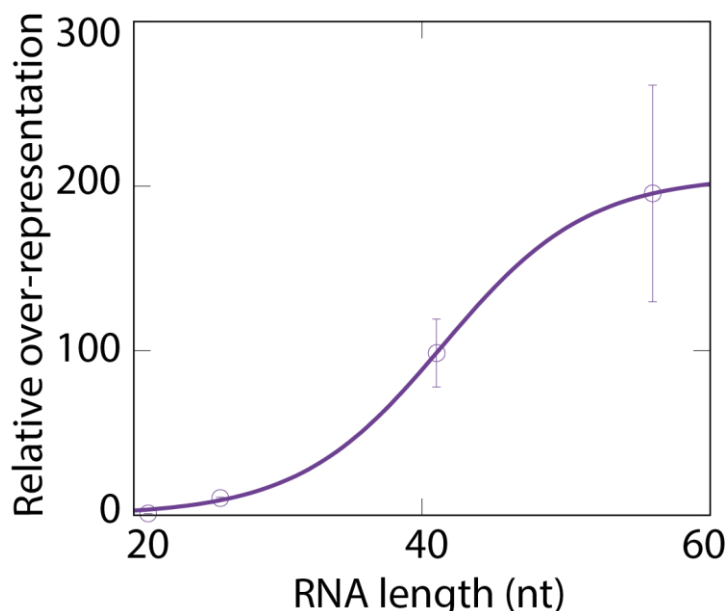


Figure S1. Calibration curve for sequencing data. The sequencing procedure biases the number of sequences toward longer ones (over the size range in this study). Here, four RNAs (corresponding to **RNA1** stem + 0, 1, 4 and 7 mobile units corresponding to S_0 , S_1 , S_4 and S_7) were mixed in equimolar proportions and sequenced. The x-axis corresponds to the length of the RNA, and the y-axis corresponds to the relative over-representation of reads compared to $\frac{\text{number of reads of } S_n}{\text{number of reads of } S_0}$. The error bars correspond to the standard errors extracted from triplicates. The calibration curve (solid line) is $y = \frac{a}{b + \exp(-c(n-21)/5)}$, with n being the length of the RNA, y the relative over-representation. The fitted parameters are $a = 3.5 \pm 1.3$, $b = 0.017 \pm 0.006$ and $c = 1.0 \pm 0.1$.

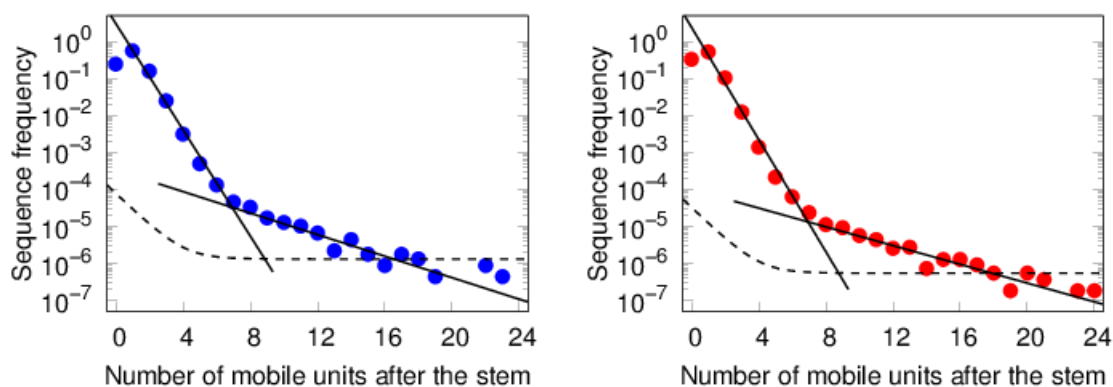


Figure S2. (a) In blue. This graph shows all the product sequences S_n detected in the entire calibrated sequencing data and their relative proportions, in the **RNA1** processing after 45min of reaction. The data points up to S_7 are the same as in **Figure 2c**. The maximum sequence length detected is S_{23} . There are two exponential decay regimes with the sequence length, i.e., the number of units (regression lines for each are shown as solid black lines); the former ($S_1 \sim S_7$) is predicted by the kinetic model (**Figure 2c**), while the latter ($S_8 \sim S_{23}$) is not taken into account in the model. The dashed line indicates the calibrated limit of detection (Material and Methods and **Figure S1**). (b) In red. The same plot displaying the **RNA3** processing (**Figure 4b**).

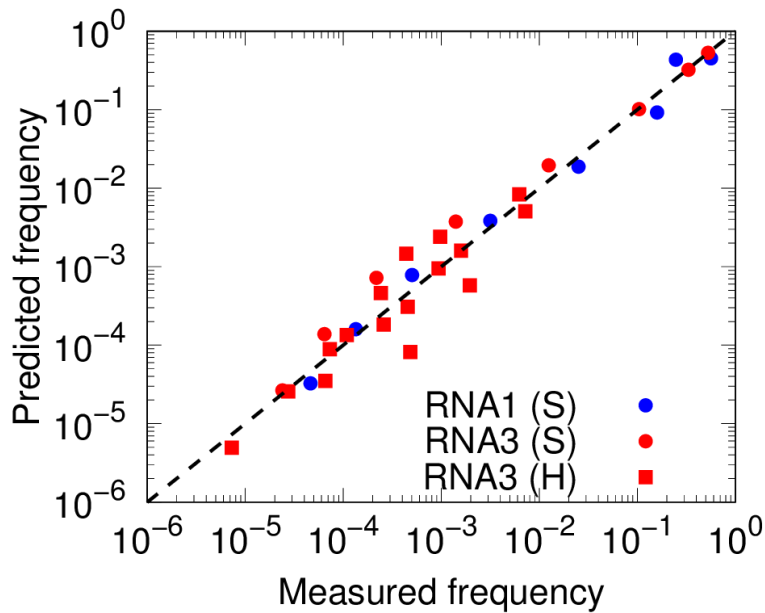


Figure S3. The scatter plot for the measured (x-axis) and predicted (y-axis) frequencies of RNA sequences (the same data set as in **Figure 2c** or **Figure 4b**). Circle and square points denote the data set for S_n ($0 \leq n \leq 7$) and $H_{m,n}$ ($0 \leq m, n \leq 3$), respectively. The colors (blue or red) represent the data set in **RNA1** or **RNA3** processing, respectively. The dashed line is for $y=x$. The correlation coefficient r is calculated as $R^2 = 0.988$ for **RNA1** (blue), and $R^2 = 0.940$ for **RNA3** (red) and the p-value is calculated as 6.0×10^{-7} and 6.5×10^{-15} for **RNA1** and **RNA3** respectively.

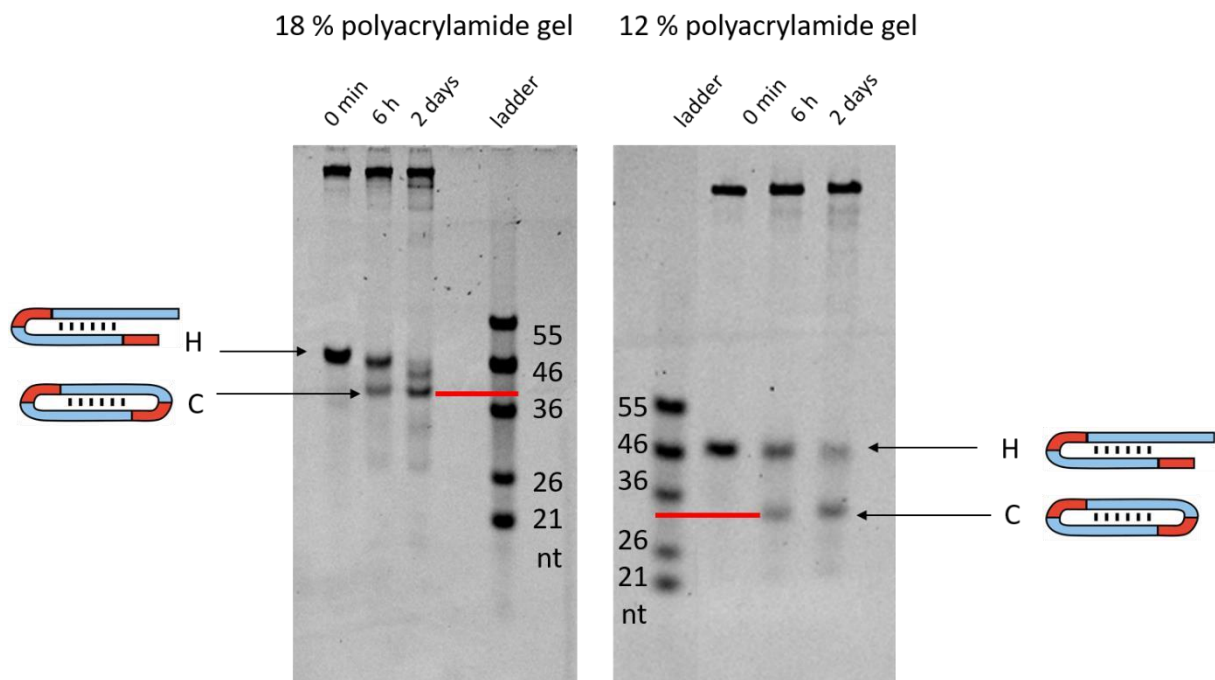


Figure S4. Demonstration of the cyclic nature of certain RNA products. The hairpin RNA (H) has the sequence of both **RNA2**'s and **RNA3**'s intermediate product when processed by *Azoarcus* (confirmed with sequencing). The sample was run on both 18% and 12% polyacrylamide gels. The band corresponding to the circular RNA (C) product migrates slower

than the 36 nt reference band (see ladder) in the 18 % gel and faster than the same band in the 12% gel which is the hallmark of circular RNA.^{18,19}

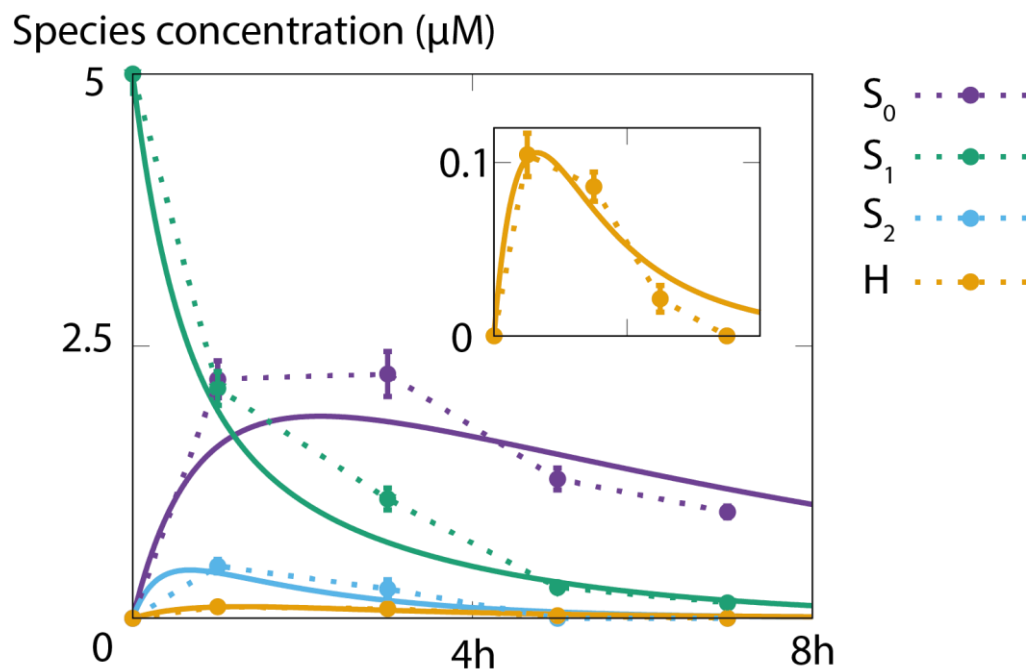
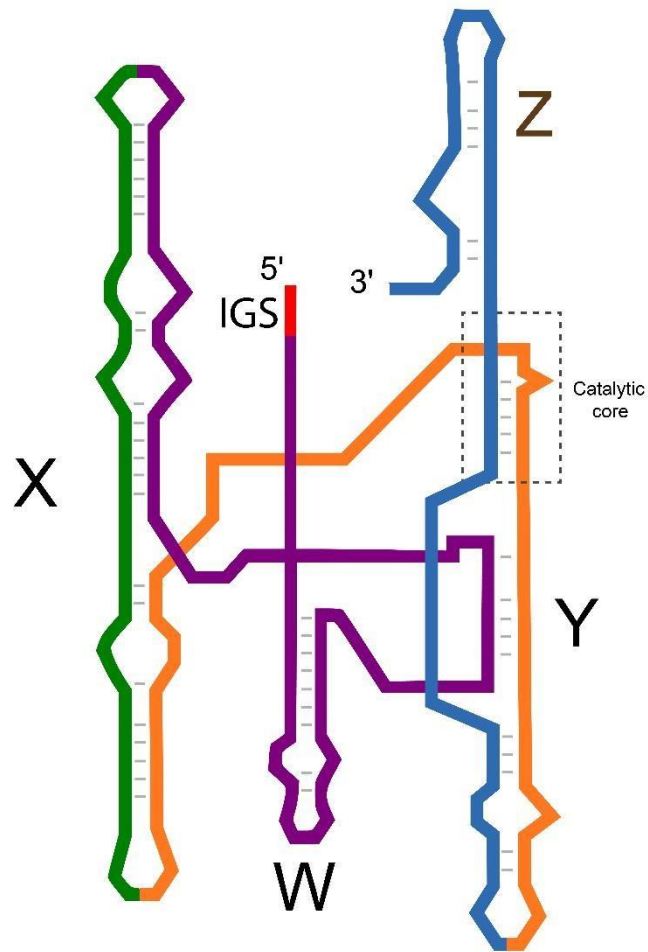


Figure S5. Graph showing the evolution of the concentrations of **RNA3** (S_1), product without a mobile unit (S_0), product with two mobile units (S_2), and hairpins (H), when reacting with the covalent *Azoarcus* ribozyme. The experimental values extracted from the band intensities are represented by dots (connected by a dotted line) and the concentrations predicted by the model are represented by solid lines. The error bars represent standard deviations from triplicates. The conditions for the reaction are the same as in **Figure 2b** and **3b**. The inset depicts H species concentration variation at lower values.



WXYZ sequence:

GUGCCUUGCGCCGGGAAACCACGCAAGGAAUGGUGUCAAAUUCGGCGAAACCUAAGCG
 CCCGCCGGGCGUAUGGCAACGCCGAGCCAAGCUUCGGCGCCU GCGCCGAUGAAGGUG
 UAGAGACUAGACGGCACCCACCUAAGGCAAACGCUAUGGUGAAGGCAUAGUCCAGGGA
 GUGGCGAAAGUCACACAAACCGG

Figure S6 Scheme of the full length *Azoarcus* ribozyme (WXYZ) secondary structure.⁴ The W, X, Y and Z parts are depicted in purple, green, orange, and blue respectively. The IGS (the internal guide sequence which corresponds to the 5' GUG) is depicted in red.

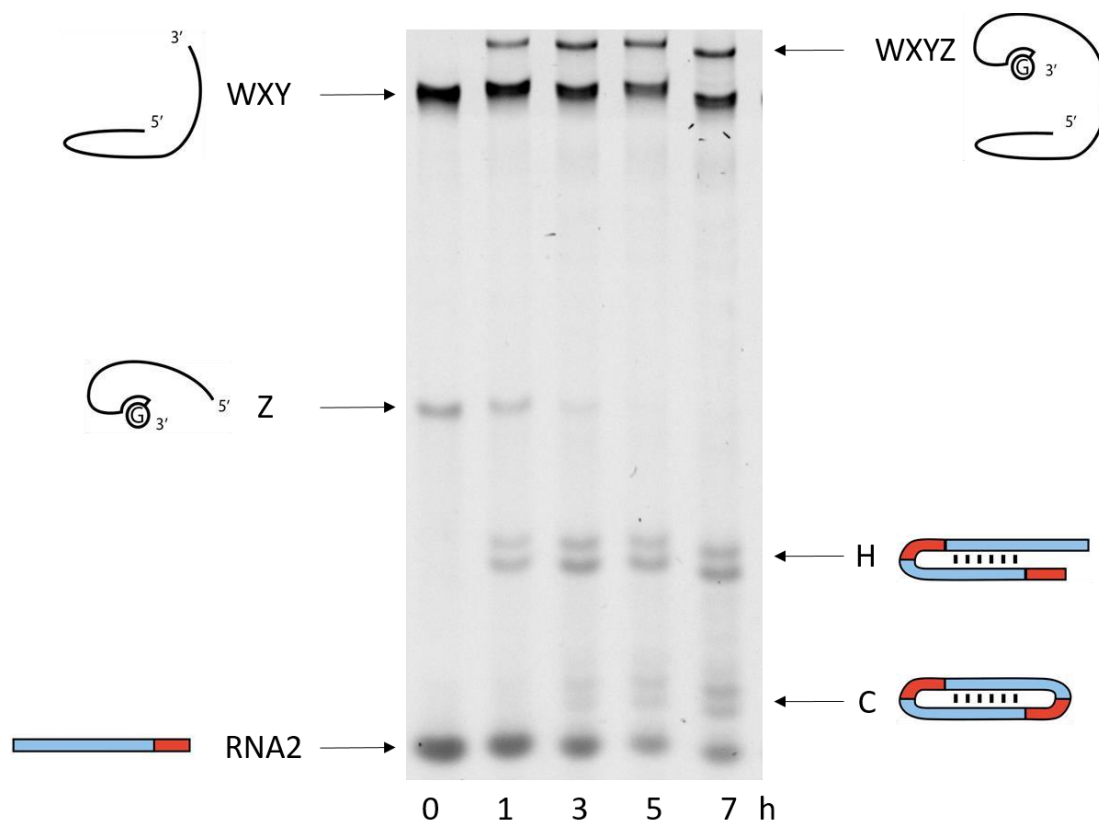


Figure S7. RNA2 processing and *Azoarcus* self-reproduction from WXY and Z on a 12 % polyacrylamide gel. The double bands for RNA2 products account for two possible sites for transesterification, as observed in sequencing data. The experimental conditions are the same as in **Figure 5b**.

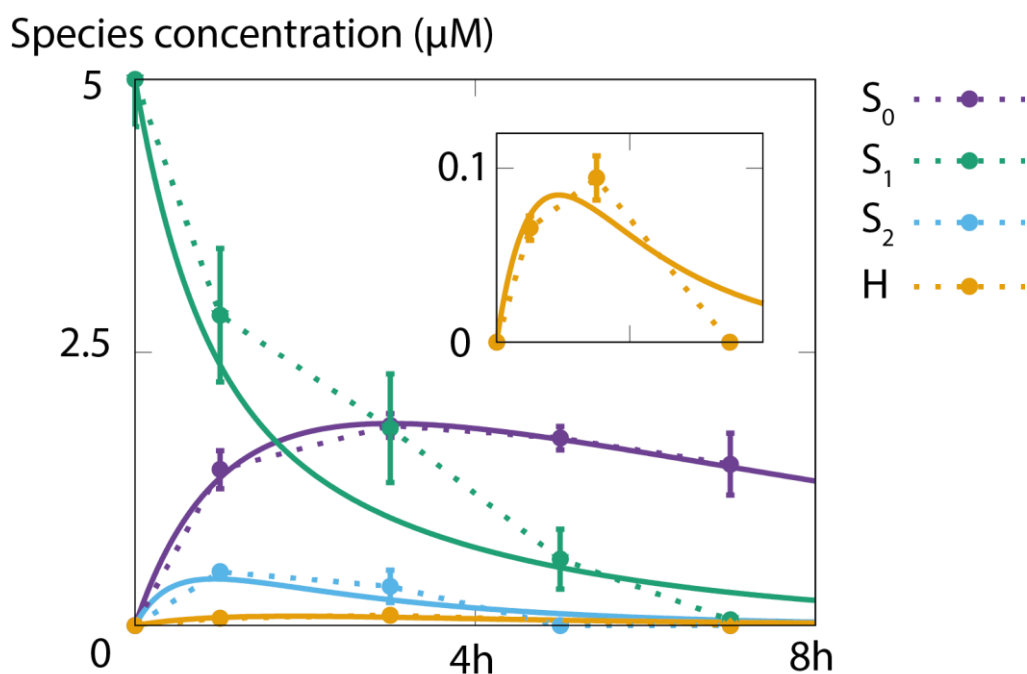


Figure S8. Time course of RNA3 processing seeded with WXY and Z instead of WXYZ. The time course of the product is similar to with RNA3 + WXYZ (see **Figure S5**), with newly fitted parameters, which account for the inhibitory effects of free Z strand and the lower efficiency of the WXY:Z non-covalent complex (see Model for RT+TSA mechanism in Material and

Methods). The experimental values extracted from the band intensities are represented by dots (connected by a dotted line) and the concentrations predicted by the model are represented by solid lines. The error bars represent standard deviations from triplicates. The dynamics predicted by the combined kinetic model match well with the experimental data. The inset depicts H species concentration variation at lower values.

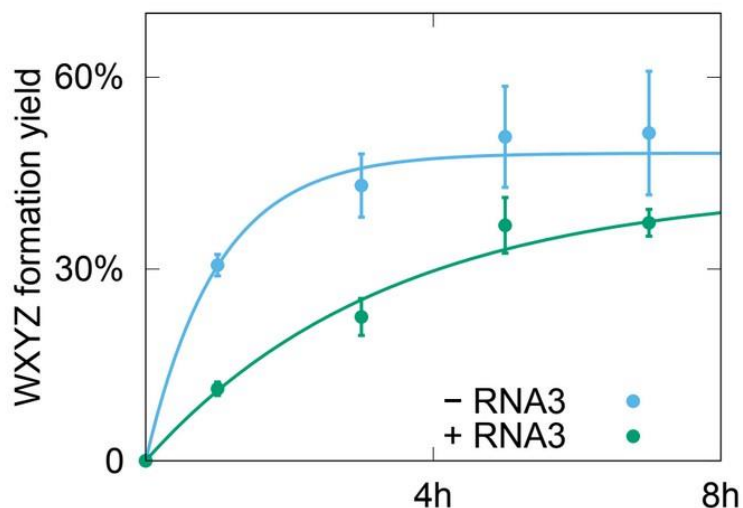


Figure S9. Time course of WXYZ production with and without **RNA3**. WXYZ still forms despite the presence of 10 times more of the competitor (RNA3) with catalytic rates reduced by around 75%. The initial conditions are: $[WXY] = [Z] = 0.5 \mu\text{M}$ and $[\text{RNA3}] = 5 \mu\text{M}$. The dots represent PAGE data and the solid lines represent the theoretical fitting (see Model for WXYZ self-reproduction in Materials and Methods).

5.2.2.iii Materials and methods

Materials

All chemicals were purchased from Merck (unless specified otherwise). For all the reactions, water was used from ThermoFisher Scientific (UltraPure™ DNase/RNase free) or from a MilliQ water purifier system (Millipore). RNA concentrations were measured on a NanoDrop1000 UV-spectrophotometer (Peqlab). Denaturing polyacrylamide gels were prepared using gel stock solution from Roth and run in 1 × TBE (Tris-Borate ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)), prepared from 10 × TBE from Roth). All analyses were performed using 12% to 18% denaturing polyacrylamide gels containing 8.3 M urea and run for at least 2–3 h at constant power of 24 W. Gels were stained with 1 × SYBR Gold (ThermoFisher Scientific). Gel analysis and calculation of conversions were carried out with ImageJ software

(<https://imagej.nih.gov/ij/>). The extraction of relevant RNA concentrations from band intensities were carried out by calibration to band intensities of same-length RNA of the same length with known concentrations from 1 to 5 μM. All DNA oligonucleotides were obtained from IDT DNA technologies (<https://eu.idtdna.com>) and are described in **Table S1**.

Table S1 DNA primers and templates for PCR and *in vitro* transcription used in the study

Oligo name	Sequence (5' to 3')	Description
Primer1	CTGCAGAATTCTAATACGACTCA <u>CTATAGTGCCTAGCGCCGGGAA</u> ACCACGCTAGGGATGG	Forward primer to generate dsDNA template, by PCR, adding a T7 promoter (underlined), for transcription of the WXYZ ribozyme or WXY fragment with GUG as IGS
Primer 2	ATGTGCCTTAGGTGGGTGC	Reverse primer to generate dsDNA template to produce WXY with CAU tag
Primer 3	TAATACGACTCACTATAGGCATC GCTATGGTGAAGGCATAG	Forward primer to generate dsDNA template to produce Z
Primer 4	CCGTTTGTGTGACTTTCGCC	Reverse primer to generate dsDNA template to produce Z and WXYZ
Primer 5	GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTTT TTT TTT TTT TTT VN	Primer for cDNA synthesis and to add Read2 (library preparation)
Primer 6	ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT -rGrGrG	Template Switching Oligo, to add Read1 (library preparation)
Primer 7	AATGATACGGCGACCACCGAAC ACTCTTCCCTACACGACGCTCT TCCGATCT	P5-Read1 (library preparation)

Primer 8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAG AT-index- GTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTT	P7-index-Read2 (library preparation)
WXYZ template DNA	GTGCCTTGCGCCGGGAAACCAC GCAAGGAATGGTGTCAAATTCG GCGAAACCTAAGCGCCCGCCCG GGCGTATGGCAACGCCGAGCCA AGCTTCGGCGCCTGCGCCGATG AAGGTGTAGAGACTAGACGGCA CCCACCTAAGGCAAACGCTATG GTGAAGGCATAGTCCAGGGAGT GGCGAAAGTCACACAAACCGG	Plus strand of the dsDNA template used to generate WXYZ, WXY and Z dsDNA templates, by PCR, for <i>in vitro</i> transcription .

RNA preparation

The *Azoarcus* ribozyme (WXYZ) and WXY RNA fragment were prepared by *in vitro* transcription. The dsDNA templates were produced using standard PCR reactions (see below). For PCRs ~18 pg of plasmid bearing dsWXYZ was mixed with 1x PCR buffer (ThermoFisher Scientific), 0.75 μ M of each forward and reverse primer (see **Table S1**), 0.2 mM of each dNTP, 0.02 U/ μ L Hot Start Phusion polymerase (ThermoFisher Scientific, product no.: F-549-L) and thermocycled as follows: step 1: 98 °C / 30 s, step 2: 98 °C / 10 s, step 3: 57 °C / 30 s, step 4: 72 °C / 30 s with 24 additional cycles from step 2 to 4 and final extension at 72 °C / 3 min. The purity of the dsDNA was checked on a 2% agarose gel (stained with GelRed™, run under standard electrophoresis conditions; 1 \times Tris-acetate-EDTA (TAE), 110 V, 40 min). After PCR, amplified dsDNA templates were ethanol precipitated (2.5 x volume, -80 °C for 30 min, centrifuged for 30 min at 11 000 rcf), pellets were washed with 70% ethanol, dissolved in water and used directly for *in vitro* transcription. *In vitro* transcription was performed using HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England BioLabs) at 50 μ L scale, the RNAs were purified by a phenol-chloroform extraction (Acid-Phenol:Chloroform, pH 4.5, Invitrogen) followed by an ethanol precipitation. The RNAs were resuspended in RNase free water, mixed with an equivalent volume of gel loading buffer (70% formamide, 130 mM EDTA, 0.1% xylene cyanol, 0.1% bromophenol blue) and purified on 12% denaturing polyacrylamide gels (urea 50%) using standard electrophoresis conditions (1 \times TBE buffer, run at 24 W for 2 - 3 h). Transcript bands were excised, crushed and eluted in 500 μ L 0.3 M NaAcetate overnight at 26 °C. The eluted solution was micro-filtered with 0.2 μ m Minisart Syringe Filters, ethanol precipitated, washed with 70 % ethanol, dissolved in water and concentrations measured with Nanodrop (ND-ONE-W ThermoFisher Scientific). Z fragment and other RNA oligonucleotides mentioned in this study were from Integrated DNA Technologies and used without further purification.

Trans-esterification RNA reactions

For the trans-esterification reactions, *Azoarcus* ribozyme (0.5 μ M), or WXY and Z (0.5 μ M each), were mixed in water with the RNA substrate (5 μ M each). To fold the RNA, the mixture

was heated at 80 °C for 3 min and gradually cooled down to 20 °C (at a rate of 0.1 °C/s). Then 60 mM of MgCl₂ was added and the reaction was incubated at 44 °C. Self-reproduction experiments of **WXYZ** followed the previously established protocols, including the use of an equimolar mixture (0.5 μM) of two RNA derived by fragmenting *Azoarcus* – **WXY** and **Z**.^{5,20} In this study, the ribozyme contains 5'-GUG as an IGS and all RNA substrates 3'-CAU as a tag. Experimental data were acquired by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in triplicate and species distributions measured by next-generation sequencing by adapting the Smart-Seq protocol. The parameters of the kinetic model of the reactions were obtained after fitting to PAGE data only.

RNA library preparation and Next Generation Sequencing

The reaction mixtures for sequencing were prepared as described above and stopped with one volume of the gel loading buffer. After denaturing gel extraction and ethanol precipitation with glycogen carrier (Merck), the RNAs were dissolved in water. The RNA libraries were prepared according to the SMARTseq procedure.²¹ For the polyadenylation step, ~ 200 ng of RNA were mixed with 2 mM of ATP, 60 U/μL of Poly(A) Polymerase (from Yeast, ThermoFisher Scientific), 1 x corresponding reaction buffer, and incubated for 10 min at 16 °C. The solutions were then cooled on ice for 1 min, mixed with 17 μM of polyT oligonucleotide (**see Table S1**), incubated for 3 min at 72 °C and cooled on ice again for 1 min. For the cDNA synthesis step, the solutions were mixed with 0.5 mM of each dNTP, 5 mM of DTT (1,4-dithiothreitol), 5 μM of the template switching oligonucleotide (**see Table S1**), 24 U/μL of SuperScript III (ThermoFisher Scientific), 1 x of the corresponding buffer, and incubated for 60 min at 55 °C and for 15 min at 70 °C. For the PCR step, 40 % of the previous solutions were mixed with 0.2 mM of dNTP, 0.5 μM of indexed forward and reverse primers (**see table**), 0.02 U/μL of Hot Start Phusion polymerase and 1 x of the corresponding buffer and thermocycled as follows: step 1: 98 °C / 30 s, step 2: 98 °C / 15 s, step 3: 72 °C / 45 s with 12 additional cycles from step 2 to 3 and final extension at 72 °C / 3 min. Libraries were barcoded using P5 primers containing 6 nt sequences from the NEXTflex series (Illumina). dsDNAs were extracted and eluted with a PCR Clean-up kit (Macherey Nagel). Length profiles were assessed with capillary electrophoresis (Agilent 2200 TapeStation, using high sensitivity D1000 ScreenTape®, Product No.: 5067-5584) and non-specific amplifications (shorter than the library minimal size and longer than 700 nucleotides) were cut off using AMPure XP Beads. The concentration of the dsDNA library was measured using Nanodrop, Qubit (dsDNA HS Assay Kit) and qPCR with the NEBNext Library Quant Kit for Illumina (New England BioLabs). The indexed libraries were pooled and ~ 8 ng were sequenced with 30% PhiX using the Illumina NextSeq 550 system in 2*150 High Output mode at the Genotyping and Sequencing Core Facility, ICM Paris (iGenSeq, Institut du cerveau et de la moelle épinière).

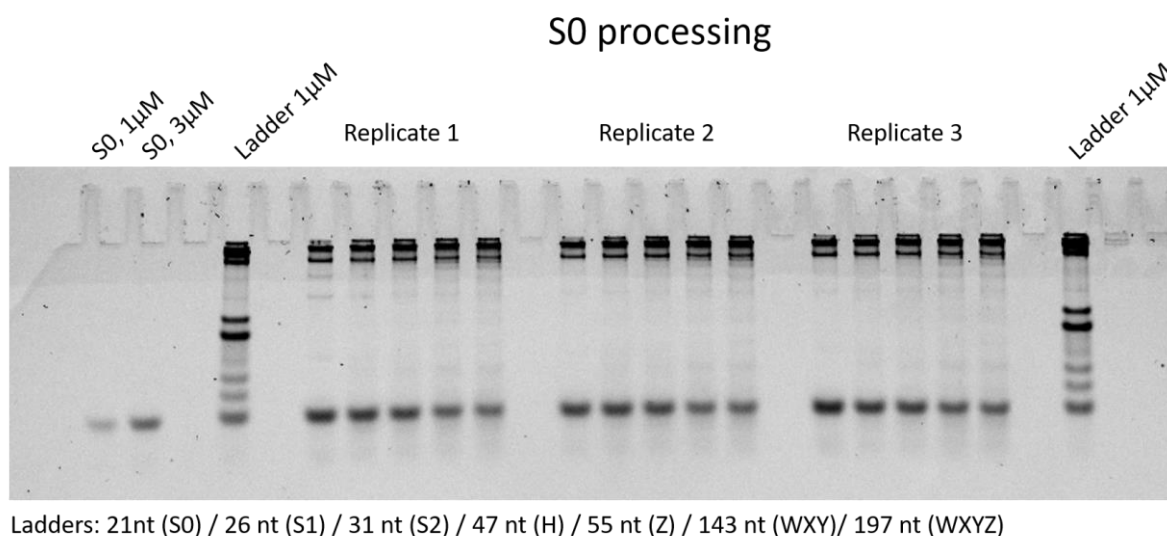
Sequencing data processing

FASTQC files were processed by a custom Python script. The files were first cleaned and the reads trimmed after the polyA tail to discard ligation products formed during library preparation. All sequences were sorted according to their sequence and counted to generate the distributions shown in **Figure 2c** and **Figure 4b**.

The limits of detection of RNA sequencing (dashed lines in **Figure 2c** and **Figure 4b**) are defined as the RNA species frequency f above which there is more than 95% probability to detect at least one sequencing read. These limits are computed assuming a Poisson statistic of species capture from the RNA mixture, resulting in $f = \frac{-\ln(0.05)}{N}$, where N is the number of reads used for the analysis. For **RNA1** and **RNA3** sequencing, we find $f = 2.43 \times 10^{-5}$ and $f = 9.11 \times 10^{-6}$ respectively. For consistency with the calibrated sequencing data, the dashed lines in **Figure 2c** and **Figure 4b** represent these limits after calibration and normalization (see **Figure S1**).

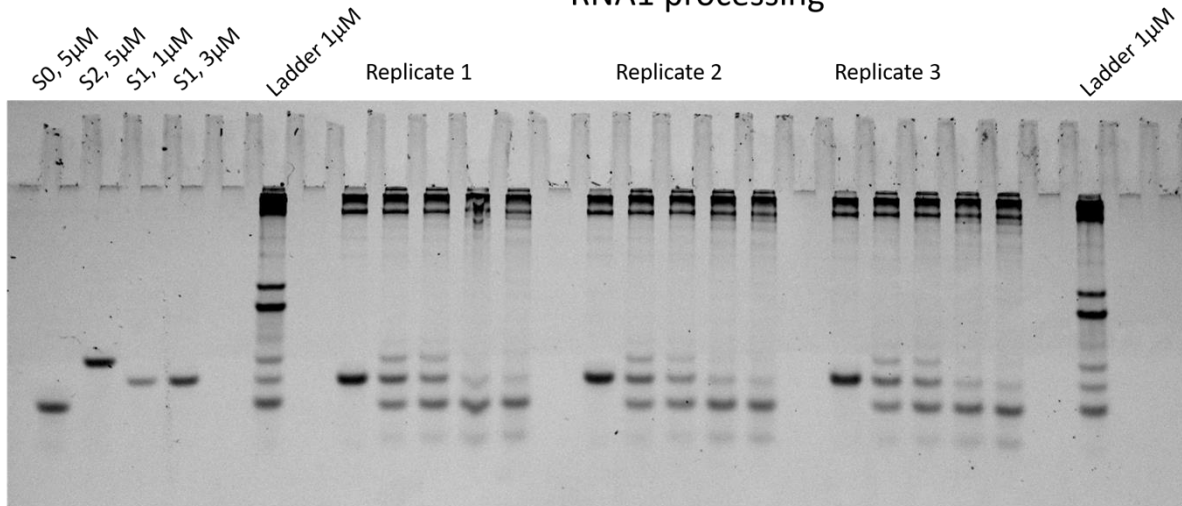
5.2.2.iv Gel images used for the study

All the poly-acrylamide gels are 18% acrylamide unless stated otherwise. They all show the same reaction in triplicate. The time points for all replicated reactions displayed on the following gels (Replicate 1, Replicate 2, Replicate 3) are from left to right: 0h, 1h, 3h, 5h, 7h. All the reactions are set with 60 mM of $MgCl_2$ at 44 °C. The bands at the left of the first ladder correspond to known fragments at different concentration used to calibrate the size-dependent ratio between band intensity and RNA concentration.



Gel 1. Stability assay of the stem S_0 ($5 \mu M$) of RNA1 in contact with *Azoarcus* ($0.5 \mu M$). The time points for Replicate 1, Replicate 2 and Replicate 3 are from left to right: 0h, 1h, 3h, 5h, 7h.

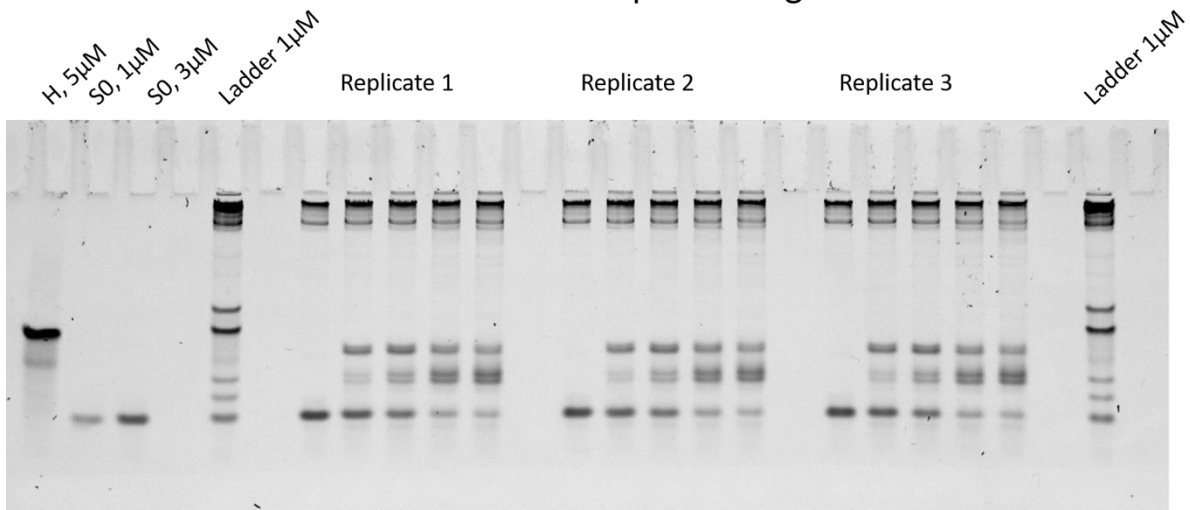
RNA1 processing



Ladders: 21nt (S0) / 26 nt (S1) / 31 nt (S2) / 47 nt (H) / 55 nt (Z) / 143 nt (WXY) / 197 nt (WXYZ)

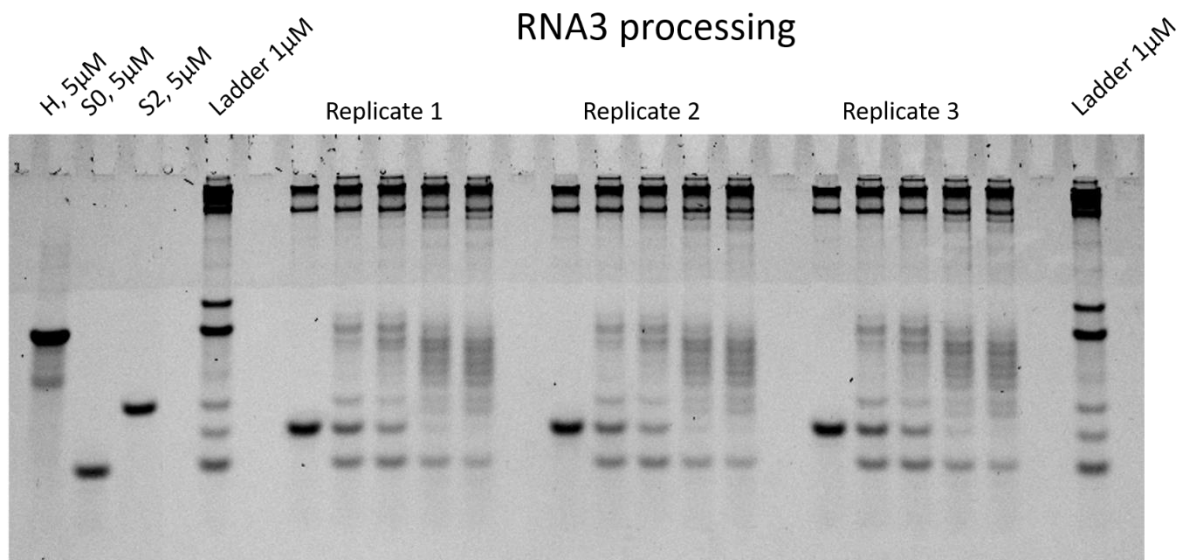
Gel 2. RNA1 (5 μ M) processed by *Azoarcus* ribozyme (0.5 μ M). The time points for Replicate 1, Replicate 2 and Replicate 3 are from left to right: 0h, 1h, 3h, 5h, 7h.

RNA2 processing



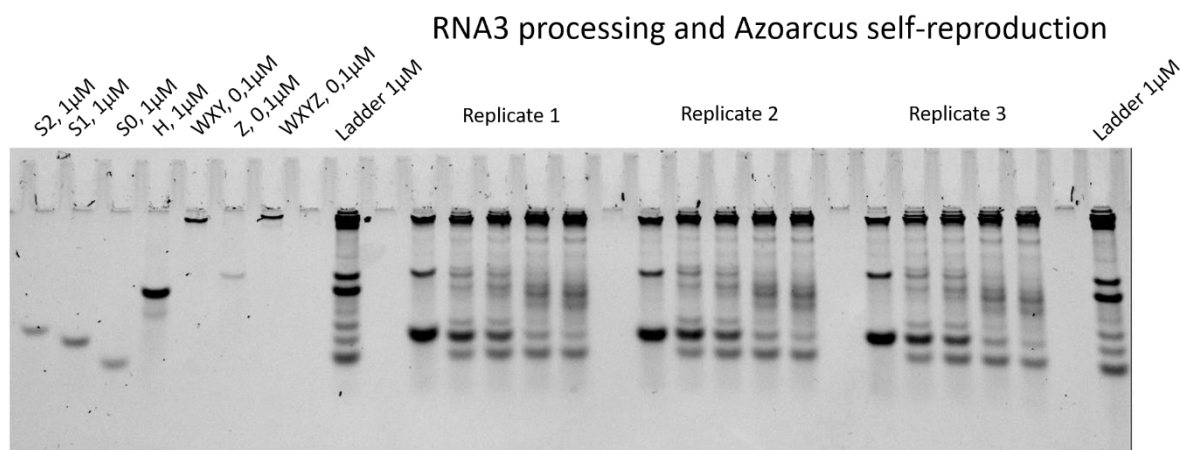
Ladders: 21nt (S0) / 26 nt (S1) / 31 nt (S2) / 47 nt (H) / 55 nt (Z) / 143 nt (WXY) / 197 nt (WXYZ)

Gel 3. RNA2 (5 μ M) processed by *Azoarcus* ribozyme (0.5 μ M). The time points for Replicate 1, Replicate 2 and Replicate 3 are from left to right: 0h, 1h, 3h, 5h, 7h.



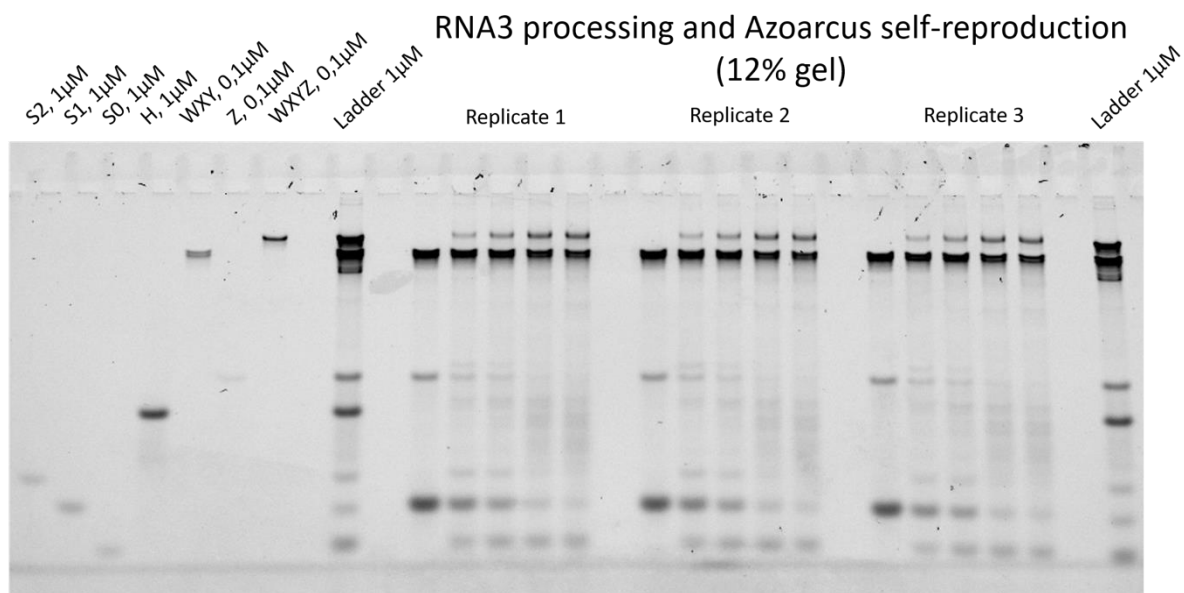
Ladders: 21nt (S0) / 26 nt (S1) / 31 nt (S2) / 47 nt (H) / 55 nt (Z) / 143 nt (WXY)/ 197 nt (WXYZ)

Gel 4. RNA3 (5 μ M) processed by *Azoarcus* ribozyme (0.5 μ M). The time points for Replicate 1, Replicate 2 and Replicate 3 are from left to right: 0h, 1h, 3h, 5h, 7h.



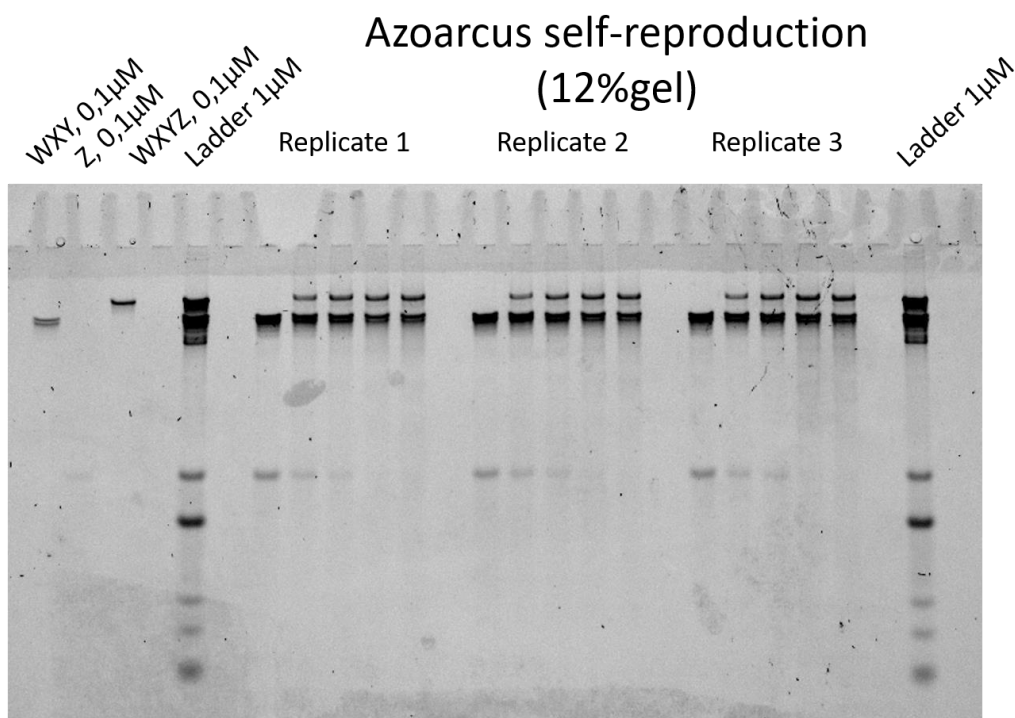
Ladders: 21nt (S0) / 26 nt (S1) / 31 nt (S2) / 47 nt (H) / 55 nt (Z) / 143 nt (WXY)/ 197 nt (WXYZ)

Gel 5. RNA3 (5 μ M) processing and *Azoarcus* ribozyme self-assembly from WXY (0.5 μ M) and Z (0.5 μ M) RNA fragments (gel ran to visualize RNA3's products). The time points for Replicate 1, Replicate 2 and Replicate 3 are from left to right: 0h, 1h, 3h, 5h, 7h.



Ladders: 21nt (S0) / 26 nt (S1) / 31 nt (S2) / 47 nt (H) / 55 nt (Z) / 143 nt (WXY) / 197 nt (WXYZ)

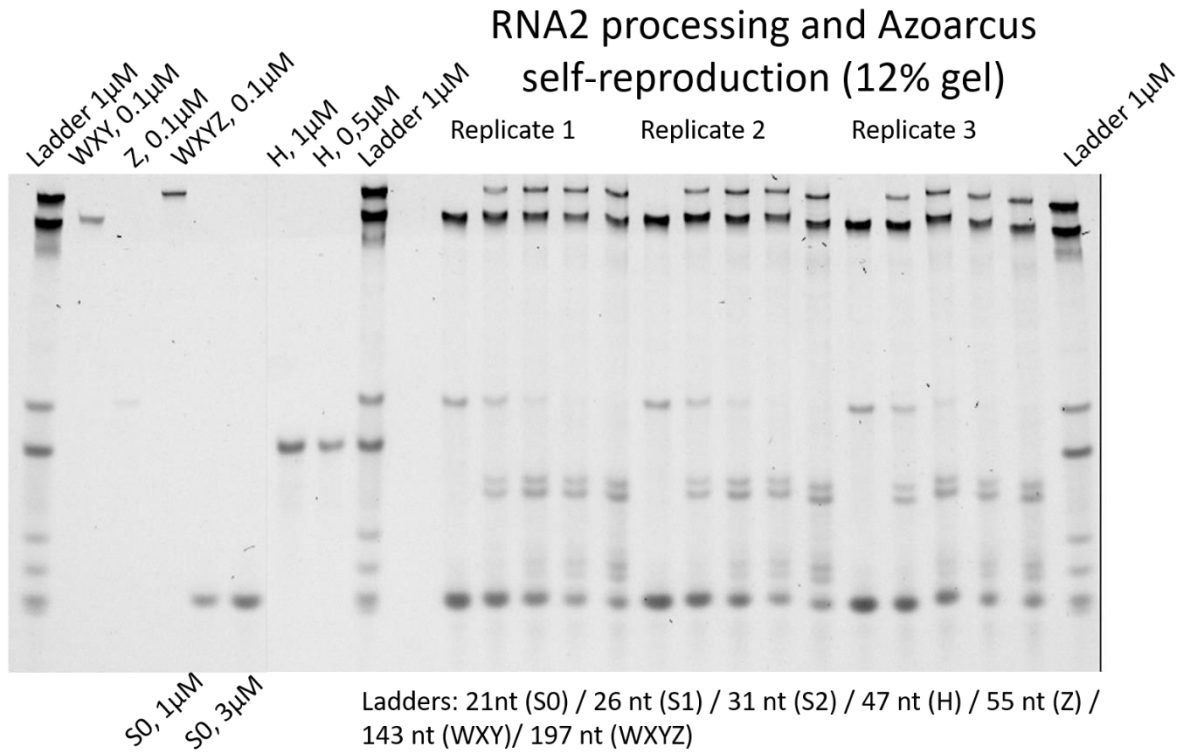
Gel 6. 12% acrylamide gel of RNA3 (5 μM) processing and *Azoarcus* ribozyme self-assembly and WXY (0.5 μM) with Z (0.5 μM) RNA fragments (gel ran to visualize WXYZ selfassembly). The time points for Replicate 1, Replicate 2 and Replicate 3 are from left to right: 0h, 1h, 3h, 5h, 7h.



Ladders: 21nt (S0) / 26 nt (S1) / 31 nt (S2) / 47 nt (H) / 55 nt (Z) / 143 nt (WXY) / 197 nt (WXYZ)

Gel 7. 12% acrylamide gel of *Azoarcus* ribozyme self-assembly and WXY (0.5 μM) with Z (0.5 μM) RNA fragments. The time points for Replicate 1, Replicate 2 and Replicate 3 are from left to right: 0h, 1h, 3h, 5h, 7h.

8.



Gel 8. 12% acrylamide gel of RNA2 (5 μM) processing and *Azoarcus* ribozyme self-assembly and WXY (0.5 μM) with Z (0.5 μM) RNA fragments. The time points for Replicate 1, Replicate 2 and Replicate 3 are from left to right: 0h, 1h, 3h, 5h, 7h.

5.2.2.v Full details of mathematical models

Model for RT (RNA1 processing)

The RT reaction is modelled by the equation: $S_n + S_m \rightarrow S_{n+p} + S_{m-p}$, with rate k , which is assumed to be independent of n , m and p . n and m are the numbers of mobile units carried by a stem S , and p is the number of transferred mobile units. In addition, we implement the potential loss of mobile units by hydrolysis when linked to the ribozyme. This effective removal is represented by the reaction: $S_n \rightarrow S_{n-p}$, assumed to occur at the rate δ irrespective of the number of mobile units p . Finally, the slight ribozyme-catalyzed decay of the stems is considered and occurs at the rate δ' : $S_n \rightarrow \emptyset$. Although the kinetic rates of these reactions, k , δ and δ' , depend on the amount of the ribozyme, we assume the rates are constant since the ribozyme concentration does not change significantly in the time scale of the experiments. The rate equation for the dynamics of S_n concentration, s_n is

$$\dot{s}_n = k \sum_{\substack{i+j \geq n \\ i \neq n}} s_i s_j - k s_n (n s + \gamma) - \delta \left(n s_n - \sum_{i=n+1}^{\infty} s_i \right) - \delta' s_n$$

where the total mass of stems is $s = \sum_{i=0}^{\infty} s_i$ and of mobile units is $\gamma = \sum_{i=1}^{\infty} i s_i$. The first and second terms represent the production and consumption rate of s_n by the transfer reactions, the

third term represents the degradation of mobile units, and the last term represents the decay of the stem. We adjusted the parameters k and δ to fit the species concentrations with the gel electrophoresis data for each time point. We determined the δ' parameter from a separate experiment: the degradation of **RNA1**'s stem (S_0 ; 5 μM) in the presence of *Azoarcus* ribozyme (0.5 μM) in the same conditions (44°C, 60 mM MgCl_2) as the other experiments of the study. Even though the kinetic model has only 3 parameters, the time course of the amount of the species fits the gel data well (**Figure 2b**, the fitted parameters are as follows: $k = 0.11 \pm 0.01 \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$, $\delta = 0.39 \pm 0.03 \text{h}^{-1}$ and $\delta' = 0.093 \pm 0.007 \text{h}^{-1}$). In the time course, first s_0 and s_2 increase as s_1 decreases, then subsequently all species except s_0 decrease to eventual extinction, and finally s_0 also gradually decreases.

Here, we briefly discuss the trends in time course, and the exponential distribution in the sequence frequency. Under the assumption that only S_1 exists at the initial condition, and using the expression:

$$s_n(t) = s_1(t)(1 - a(t))^{n-1} \quad (n \geq 1),$$

we can reduce the rate equations into that of only three variables $s_0(t)$, $s_1(t)$ and $a(t)$,

$$\dot{s}_0 = k \frac{s_1}{a^2} (s_1 - (1 - a)s_0) + \delta \frac{s_1}{a} - \delta' s_0,$$

$$\dot{s}_1 = -s_1 \left(k \frac{2}{a} (s_1 - (1 - a)s_0) + \delta \left(2 - \frac{1}{a} \right) + \delta' \right),$$

$$\dot{a} = -k(s_1 - (1 - a)s_0) + \delta(1 - a), \text{ where the initial}$$

conditions are $a(0) = 1$ and $s_0(0) = 0$.

These rate equations have three parameters k , δ and δ' , which are associated with three trends in the dynamics. The terms with coefficient k due to the transfer reaction in the equations explain the initial increase of s_0 and the decrease of s_1 and a (i.e., the increase of $s_2 = s_1(1 - a)$), until they reach close to the partial equilibrium $s_1 \sim (1 - a)s_0$. Next, after the terms with coefficient δ become dominant, due to degradation of mobile units, a increases to 1 (i.e., s_2 decreases to extinction). Finally, when the terms with δ' become dominant due to the decay of stems, then s_0 starts to decrease. Thus, to fit the first trend the model requires only the reaction which transfers mobile units, while to fit the latter two trends it requires two types of degradation reactions, respectively.

Also, the time dependent solution for the equations, $s_n(t)$ ($n \geq 1$), explains the sequence frequency ($S_0 \sim S_7$) showing the exponential distribution in **Figure 2c**. And its decay factor (at $t=45$ min), i.e., $\ln(1 - a(t))$ can be predicted from the kinetic parameters (k , δ and δ') which were obtained from only the time course data of S_0 , S_1 and S_2 (**Figure 2b**); the decay factor in the sequencing data ($S_1 \sim S_7$) is measured as -1.569 ± 0.057 , which well agrees with the model prediction: $\ln(1 - a(t = 45 \text{ min})) = -1.589$.

Model for TSA (RNA2 processing)

Production of hairpin and circular RNAs by the TSA mechanism are depicted by the following reactions: $S + S \rightarrow H$, and $H \rightarrow C$, at the rates k_1 and k_2 . We assume the degradation of the RNA species is negligible in the time scale of experiments due to the presence of more stable hairpins and cyclic RNA species. The rate equations for their concentrations, s , h and c are:

$$\dot{s} = -k_1 s^2, \quad \dot{h} = \frac{1}{2} k_1 s^2 - k_2 h, \quad \text{and} \quad \dot{c} = k_2 h,$$

respectively. Assuming the initial condition with only S present, these differential equations can be solved explicitly as functions of time:

$$s(t) = \frac{s(0)}{1+k_1 s(0)t}, \quad h(t) = \frac{s(0)}{2} \left(A(t) - \frac{1}{1+k_1 s(0)t} \right), \quad \text{and} \quad c(t) = \frac{s(0)}{2} (1 - A(t)),$$

where $A(t) = e^{-k_2 t} \left(1 + \int_0^t \frac{k_2 e^{k_2 t'}}{1+k_1 s(0)t'} dt' \right) \sim \frac{1}{1+k_1 s(0)t} + e^{-k_2 t} \frac{k_1 s(0)t}{1+k_1 s(0)t}$. Note that the total mass of stems is conserved: $s(t) + 2h(t) + 2c(t) = s(0)$. As before, we also adjusted the parameters to fit the concentrations of S, H and C predicted by these rate equations to the gel electrophoresis data. For the constraint on the conservation of stems, we introduce an additional calibration multiplying the values for H and C by the same constant ξ , which is also fitted along with the other parameters. ξ corrects the fact that H and C gel bands are wider than single sequence bands, since there are two attack sites for TSA (after the second and fourth G according to sequencing data). The fitted parameters values (**Figure 3b**) are as follows: $k_1 = 0.20 \pm 0.02 \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$, $k_2 = 0.24 \pm 0.01 \text{h}^{-1}$ and $\xi = 0.59 \pm 0.01$. The solutions $s(t)$, $h(t)$ and $c(t)$ well explain the time course of the gel data: the first rapid decrease of $s(t)$ from the initial $s(0)$, the increase followed by the decrease of $h(t)$, and the final convergence of $c(t)$ to $\frac{s(0)}{2}$.

Model for RT + TSA (RNA3 processing)

Here, as before, we assume the RT mechanism, which transfers a mobile unit between molecules, works at the same rate k for any S_n and irrespective of the number of mobile units at the 3'-end of a hairpin RNA $H_{m,n}$. We also assume the degradation of a mobile unit during the recombination reaction occurs at the rate δ , and the catalyzed decay of a stem occurs at the rate δ' . Similarly, the TSA mechanism works for any S_m and S_n at the rate k_1 or any $H_{m,n}$ at the rate k_2 . The rate equations for the concentrations of S_n and $H_{m,n}$ noted as s_n and $h_{m,n}$ are formally:

$$\begin{aligned} \dot{s}_n &= k \sum_{\substack{i+j \geq n \\ i \neq n}} s_i (s_j + h_j) - k s_n (n(s + h) + \gamma + \gamma_h) - \delta \left(n s_n - \sum_{i=n+1}^{\infty} s_i \right) - \delta' s_n \\ &\quad - k_1 s_n s, \\ \dot{h}_{m,n} &= k \sum_{\substack{i+j \geq n \\ i \neq n}} h_{m,i} (s_j + h_j) - k h_{m,n} (n(s + h) + \gamma + \gamma_h) - \delta \left(n h_{m,n} - \sum_{i=n+1}^{\infty} h_{m,i} \right) \\ &\quad - 2\delta' h_{m,n} + \frac{1}{2} k_1 s_m s_n - k_2 h_{m,n}, \end{aligned}$$

where h_n is the total of hairpin RNA with n available mobile units: $h_n = \sum_{i=0}^{\infty} h_{i,n}$, h is the total of the all hairpin RNAs: $h = \sum_{i=0}^{\infty} h_i$, and γ_h is the total mass of available mobile units within all the hairpins: $\gamma_h = \sum_{i=1}^{\infty} i h_i$. In both of the equations, the first terms are analogous to the ones used in the previous RT model, and the last terms are the ones used for the previous TSA model.

In this kinetic model, there are the five parameters: k , k_1 , k_2 , δ and δ' coming from the fusion of the two previous models. The fitted parameter values (**Figure S5**) are as follows: $k = 0.084 \pm 0.009 \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$, and $k_1 = 0.018 \pm 0.002 \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$, $k_2 = 1.0 \pm 0.2 \text{h}^{-1}$, $\delta = 0.21 \pm 0.03 \text{h}^{-1}$ and $\delta' = 0.13 \pm 0.01 \text{h}^{-1}$. The WXY+Z+RNA3 theoretical plot (**Figure S8**) is obtained by the same fitting procedure as for RNA3 only. The fitted parameter values (**Figure S8**) are: $k = 0.06 \pm 0.01 \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$, and $k_1 = 0.010 \pm 0.001 \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$, $k_2 = 0.62 \pm 0.16 \text{h}^{-1}$, $\delta = 0.17 \pm 0.03 \text{h}^{-1}$ and $\delta' = 0.11 \pm 0.01 \text{h}^{-1}$. All of the parameters are reduced by 20~60% due to the reduction of the ribozyme activity.

Here, we formally discuss that the time dependent solution $s_n(t)$ and $h_{m,n}(t)$ are indeed the combination of the solutions for the rate equations in the previous models (for RT and TSA):

First, note that $s(t)$ and $h(t)$ obey the rate equations $\dot{s} = -k_1 s^2 - \delta' s$ and $\dot{h} = \frac{1}{2} k_1 s^2 - (k_2 + 2\delta') h$, which are the same as that for TSA except the decay term, and, in principle, can be solved explicitly.

Second, applying the same procedure as we did for the model for RT, using the expression $\hat{s}_n = s_n + h_n$, and $\hat{s}_n(t) = \hat{s}_1(t)(1 - \hat{a}(t))^{n-1}$ ($n \geq 1$), then, the rate equations for s_n and h_n are reduced to:

$$\dot{\hat{s}}_0 = k \frac{\hat{s}_1}{\alpha^2} (\hat{s}_1 - (1 - \hat{a})\hat{s}_0) + \delta \frac{\hat{s}_1}{\hat{a}} - D \hat{s}_0,$$

$$\dot{\hat{s}}_1 = -\hat{s}_1 \left(k \frac{2}{\alpha} (\hat{s}_1 - (1 - \hat{a})\hat{s}_0) + \delta \left(2 - \frac{1}{\hat{a}} \right) + D \right),$$

$$\dot{\hat{a}} = -k(\hat{s}_1 - (1 - \hat{a})\hat{s}_0) + \delta(1 - \hat{a}),$$

where $D = (\delta'(2 - \alpha) + \frac{1}{2} k_1 \alpha^2 (\hat{s}_0 + \frac{\hat{s}_1}{\hat{a}}) + k_2(1 - \alpha))$, and we define $\alpha(t) = \frac{s(t)}{s(t)+h(t)}$, and then $s_n(t) = \alpha(t)\hat{s}_n(t)$ and $h_n(t) = (1 - \alpha(t))\hat{s}_n(t)$. That is, we obtain the same rate equations as the model for RT except for the terms with α , which depends on t .

Lastly, we decompose $h_{m,n}(t)$ as $h_{m,n}(t) = \beta_m(t)h_n(t)$, where $\beta_m(t)$ obeys the differential equation:

$$\dot{\beta}_m = \frac{k_1 s}{2h} (s_m - \beta_m s).$$

Therefore, the time dependent solutions $s_n(t)$ and $h_{m,n}(t)$ are constructed as:

$$s_n(t) = \alpha(t)(1 - \hat{a}(t))^{n-1} \hat{s}_1(t) \quad (n \geq 1),$$

$$h_{m,n}(t) = \beta_m(t)(1 - \alpha(t))(1 - \hat{a}(t))^{n-1} \hat{s}_1(t) \quad (n \geq 1).$$

Therefore, $h_{m,n}$ and s_n exponentially decrease with n with the same decay factor, $\ln(1 - \hat{a}(t))$. β_m and therefore $h_{m,n}$ also decrease with m , but not exponentially.

As in the case of **RNA1** processing, the sequence frequencies for S_n and $H_{m,n}$ (at $t=45$ min; **Figure 4b**) can be predicted from the five kinetic parameters (k , δ , δ' , k_1 and k_2) which were obtained from only the time course data of S_0 , S_1 , S_2 and H measured on gel (**Figure S5**); the decay factor for S_n in the sequencing data ($S_1 \sim S_7$) is measured as -1.74 ± 0.09 , which is close to the model prediction: -1.650 . Further, the decay factor for $H_{m,0} \sim H_{m,3}$ for each m is measured as -1.33 ± 0.01 , which is in the range of the measured and predicted ones for S_n as is expected by the above analysis of the kinetic model. The distribution in sequencing data and model predictions are, overall, in good agreement, although there are deviations (up to one order of magnitude) at $H_{m,0}$ and $H_{0,m}$ ($0 \leq m \leq 3$); the empirical values are larger for $H_{m,0}$, while the predicted values are larger for $H_{0,m}$. A possible explanation is a difference in the kinetic rates for hairpin formation at the end of a dimer with and without mobile units. Extremities with mobile units may form hairpins more easily than those without due to steric effects. This would cause $H_{0,m}$ to form more slowly and experimentally lead to less products than predicted.

Similarly, the formation of $C_{m,0}$ from $H_{m,0}$ is also slower, and $H_{m,0}$ would be experimentally larger than predicted.

Table S2. Parameters summary with covalent ribozymes

	δ (h^{-1})	δ' (h^{-1})	k ($\mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$)	k_1 ($\mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$)	k_2 (h^{-1})
RT only	0.39 (0.03)	0.093 (0.007)	0.11 (0.01)		
TSA only				0.20 (0.02)	0.241 (0.009)
RT + TSA	0.21 (0.03)	0.13 (0.01)	0.084 (0.009)	0.018 (0.002)	1.0 (0.2)

The values in parenthesis are the standard errors for the parameters (see model fitting procedure)

Table S3. The fitted parameters for RNA3 processing when seeded with WXY + Z:

	δ (h^{-1})	δ' (h^{-1})	k ($\mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$)	k_1 ($\mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$)	k_2 (h^{-1})
RT + TSA	0.17 (0.03)	0.11 (0.01)	0.06 (0.01)	0.010 (0.001)	0.62 (0.16)

The RT + TSA experiment is not deducible from the fitted parameters from the RT and TSA only experiments. The predictive value of the models relies on the consistency with the sequencing data.

k_1 and k_2 correspond to the kinetic rates of the formation of hairpins and cyclic RNAs respectively. In the TSA only experiment (**RNA2**), only $H_{0,0}$ and $C_{0,0}$ species are involved. In the TSA + RT experiment (**RNA3**), $H_{i,j}$ and $C_{i,j}$ (with i and j going from 0 to at least 3) are involved. In the latest case k_1 and k_2 correspond to global kinetic rates considering different types of TSA reaction that might have different kinetic rates (depending on the numbers of mobile units involved). This explains why k_1 and k_2 are different in TSA only and in RT + TSA experiments.

Model for WXYZ self-reproduction, with and without RNA3

Here, we assume that the complex formation $WXY + Z \rightarrow WXY:Z$ is very fast^{5,22} and all WXY and Z species are included in the non-covalent, yet catalytic, complex WXY:Z. The model takes

into account the two reversible reactions $WXYZ + WXY:Z \rightarrow WXYZ + WXY:Z$ and $WXY:Z + WXY:Z \rightarrow WXYZ + WXY:Z$ with the forward rates k_a and k_b , and the backward rates rk_a and rk_b , respectively. Here, we assume that the catalytic efficiencies for covalent and non-covalent ones are the same, $k_a = k_b$, as an approximation of observed rates in previous studies.^{4,6} We assume the conservation of the total mass of WXY; thus, the concentration of WXY:Z is $a_0 - a$, where a is the concentration of WXYZ, and a_0 is the initial concentration of WXY. Therefore, the rate equations for WXYZ is, $\dot{a} = a_0k_a((a_0 - a) - ra)$, which has the solution $a(t) = \frac{a_0}{1+r} (1 - e^{-a_0k_a(1+r)t})$. In the data fitting we fitted the concentrations of WXYZ predicted by the rate equation with the corresponding gel electrophoresis data (**Figure S9**). The fitted parameters in the absence of RNA3 species are $k_a = 0.97 \pm 0.07 \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$ and $r = 1.0 \pm 0.1$. Because RNA3 has a tag, it competes with Z species to bind to WXY's IGS, thus acting as an inhibitor. The fitted parameters in the presence of RNA3 species are $k_a = 0.25 \pm 0.02 \mu\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$ and $r = 1.3 \pm 0.1$.

Model fitting procedure

In fitting each model to the corresponding electrophoresis data, we optimized the parameter set α (e.g., $\alpha = \{k, k_1, k_2, \delta, \delta'\}$ in the model for RT+TSA) to minimize the weighted sum square residue:

$$\chi^2 = \sum_i \sum_j \left(\frac{y_{i,j} - y_i(t_j|\alpha)}{\sigma} \right)^2,$$

Where \sum_i is the sum over all species and \sum_j is the sum over all time points $t_j = 1, 3, 5$ and 7 , $y_{i,j}$ is the data value for the species i at time t_j , and $y_i(t|\alpha)$ is the model prediction for i using α (e.g. s_0, s_1, s_2 and h for RT+TSA). We weight each error between a data point and the corresponding model prediction by $\sigma = \max_i(\sigma_i)$, the maximum of the standard error obtained from the triplicate among all points for the species i , in order to avoid giving extra importance to data points which had a low standard deviation. The standard error for the fitted parameter α_i is computed as $\pm \sqrt{C_{ii}}$ where the covariance matrix C is the inverse of the half Hessian matrix H , $H_{ij} = \frac{1}{2} \partial_{\alpha_i} \partial_{\alpha_j} \chi^2$.²³

References

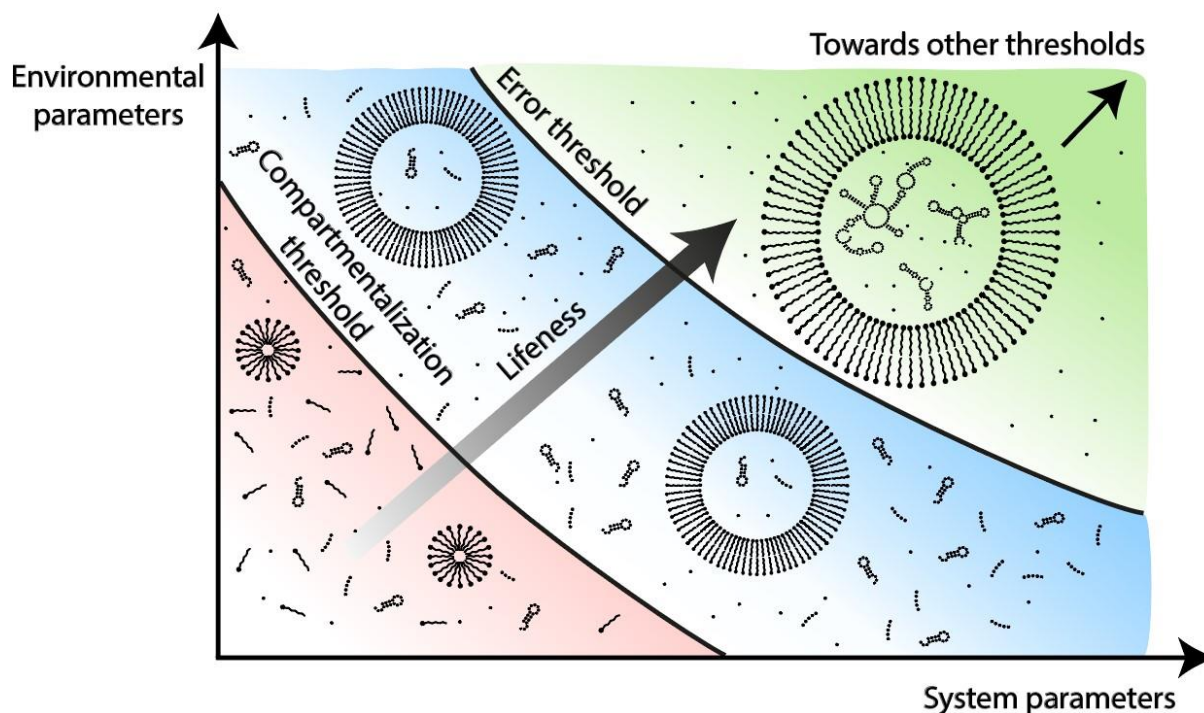
- 1 M. P. Robertson and G. F. Joyce, *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, 2012, **4**, a003608.
- 2 J. Attwater, A. Raguram, A. S. Morgunov, E. Gianni and P. Holliger, *Elife*, 2018, **7**, 1–25.
- 3 N. Paul and G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 12733–12740.
- 4 E. J. Hayden and N. Lehman, *Chem. Biol.*, 2006, **13**, 909–918.

- 5 S. Ameta, S. Arsène, S. Foulon, B. Saudemont, B. E. Clifton, A. D. Griffiths and P. Nghe, *Nat. Commun.*, 2021, **12**, 842.
- 6 E. J. Hayden, G. Von Kiedrowski and N. Lehman, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2008, **47**, 8424–8428.
- 7 W. E. Draper, E. J. Hayden and N. Lehman, *Nucleic Acids Res.*, 2008, **36**, 520–531.
- 8 M. D. Been and T. R. Cech, *Science*, 1988, **239**, 1412–1416.
- 9 B. M. Chowrira, A. Berzal-Herranz and J. M. Burke, *EMBO J.*, 1993, **12**, 3599–3605.
- 10 A. J. Zaug and T. R. Cech, *Science*, 1985, **229**, 1060–1064.
- 11 A. Blokhuis and D. Lacoste, *J. Chem. Phys.*, 2017, **147**, 094905.
- 12 T. R. Cech, A. J. Zaug and P. J. Grabowski, *Cell*, 1981, **27**, 487–496.
- 13 J. Demongeot and A. Moreira, *J. Theor. Biol.*, 2007, **249**, 314–324.
- 14 M. C. Maurel, F. Leclerc, J. Vergne and G. Zaccai, *Viruses*, 2019, **11**, 1–17.
- 15 N. Abe, H. Abe and Y. Ito, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, 2012, **1**, 1–11.
- 16 A. J. Zaug, M. M. McEvoy and T. R. Cech, *Biochemistry*, 1993, **32**, 7946–7953.
- 17 Q. Vicens and T. R. Cech, *Nat. Chem. Biol.*, 2009, **5**, 97–99.
- 18 H. F. Tabak, G. Van der Horst, A. M. J. E. Kamps and A. C. Arnberg, *Cell*, 1987, **48**, 101–110.
- 19 J. L. Litke and S. R. Jaffrey, *Nat. Biotechnol.*, 2019, **37**, 667–675.
- 20 S. Arsène, S. Ameta, N. Lehman, A. D. Griffiths and P. Nghe, *Nucleic Acids Res.*, 2018, **46**, 9660–9666.
- 21 J. J. Goetz and J. M. Trimarchi, *Nat. Biotechnol.*, 2012, **30**, 763–765.
- 22 N. Vaidya, M. L. Manapat, I. A. Chen, R. Xulvi-Brunet, E. J. Hayden and N. Lehman, *Nature*, 2012, **491**, 72–77.
- 23 W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling and B. P. Flannery, *Numerical Recipes 3rd Edition: The Art of Scientific Computing*, Cambridge University Press, Cambridge, 2007.

6. Thresholds in origin of life scenarios

This chapter is an original theoretical and practical proposition to facilitate research on the origin of life. Its elaboration is the result of the synthesis of empirical and theoretical scientific results as well as the consideration of the functioning of research on this theme. Thresholds are widespread in origin of life scenarios, from the emergence of chirality, to the appearance of vesicles, of autocatalysis, all the way up to Darwinian evolution. Here, we analyze the “error threshold” — which poses a condition for sustaining polymer replication — and generalize the threshold approach to other properties of prebiotic systems. Thresholds provide theoretical predictions, prescribe experimental tests and integrate interdisciplinary knowledge. The coupling between systems and their environment determines how thresholds can be crossed, leading to different categories of prebiotic transitions. Articulating multiple thresholds reveals evolutionary properties in prebiotic scenarios. Overall, thresholds indicate how to assess, revise and compare origin of life scenarios.

This chapter is the adaptation of the published paper: Jeancolas, C., Malaterre, C., and Nghe, P. 'Thresholds in origin of life scenarios', *iScience*, 2020, 23, 101756. doi:



6.1. Introduction

The transition from non-living to living matter is usually formulated in a historical manner, aiming to address the origin of life on Earth ^{1,2}. However, the sparsity of historical evidence suggests that the “origin of life cannot be discovered; it has to be reinvented” ³. This view, together with increasing experimental possibilities and the question of life on exoplanets ⁴ broadens the field of investigation to synthetic systems with lifelike properties ⁵, such as metabolism, reproduction and evolution ⁶.

Origin of life scenarios consist of successions of transitions. Major transitions have been outlined ^{7,8} but there are so far few empirical validations. Indeed, experiments often face huge parameter spaces and waiting times. Furthermore, studying transitions requires inputs from many disciplines, including chemistry, biochemistry, molecular biology, evolutionary biology, physics, astrophysics, geology, or geochemistry among others ⁹. Thus, it remains a challenge to decompose scenarios at a sufficiently fine-grained scale for experimental tests to be possible, while allowing articulation of elementary steps and overall plausibility estimates.

Here, we propose thresholds to be an operational notion that can be used to decompose origin of life scenarios, articulate theory and experiment, and assess scenario plausibility by coordinating interdisciplinary efforts. A threshold can be defined as a major qualitative change undergone by a physico-chemical system upon relatively minor changes in the values of

systemic or environmental control parameters. One of the most studied thresholds is Eigen's "error threshold" which constrains replication-based scenarios of early genetic polymers¹⁰⁻¹². A number of other prebiotic transitions invoke thresholds explicitly or implicitly: the appearance of homochirality¹³, replication^{14,15}, compartmentalization¹⁶, Darwinian evolution¹⁷.

Below, we first sample the diversity of thresholds found in origin of life research. Thresholds are encountered at different stages and levels of organization. In the second section, as a case study, we examine the original formulation of the "error threshold" for template-based replication, highlighting its interdisciplinary nature. In the third section, we analyze revisions to the error threshold that aim at establishing more precise or more plausible models. In the fourth section, we generalize the threshold approach to properties of prebiotic systems other than replication. Introducing a phase diagram representation notably allows us to categorize different types of threshold transitions as a function of the relationship between systems and their environment. In the fifth section, we investigate how to articulate multiple thresholds toward building complete scenarios. In turn, we determine qualitative relationships between transitions, such as entrenchment, contingency or transience. These relationships are typically used in evolutionary biology but are more generally applicable to threshold transitions. Finally, we discuss how thresholds can be used to coordinate research efforts to study the origin of life.

6.2. The diversity of thresholds in origin of life

In this section, we illustrate the diversity of threshold-type transitions in origin of life research with a non-exhaustive list of examples taken from chemistry and thermodynamics all the way up to evolutionary and Darwinian dynamics.

The prebiotic synthesis of the building blocks of life (i.e. amino acids, nucleic acids, sugars, fatty acids) requires reactants to reach sufficient concentrations for the reactions to take place, hence the existence of concentration thresholds. Concentration thresholds can be overcome by acting on physico-chemical conditions resulting from enclosure into vesicles¹⁸, wet-dry cycles¹⁹, freeze-thaw cycles^{20,21}, adsorption on mineral surfaces²² or thermophoresis effects in hydrothermal vents²³. Eutectic ice and meteoritic impacts have been pointed out to overcome a concentration threshold of hydrogen cyanide for its polymerization into purines^{24,25} (figure 1.a). This pathway to purines includes yet another threshold which concerns free-energy barriers for the formation of intermediate compounds, which could be overcome through exposition to light²⁶ (figure 1.b). Since the famous Miller's experiment²⁷, lightning is often considered to overcome such energy thresholds as well. The subsequent polymerization of building blocks (e.g. nucleotides) must also overcome energy thresholds²⁸, through chemical activation²⁹ or adsorption on mineral surfaces³⁰. More generally, when it comes to forming the chemical bonds of biomolecules, a kinetic barrier has been estimated to be around 100 kJ/mol at moderate temperature³¹. Another threshold transition in prebiotic chemistry concerns the emergence of homochirality among biomolecules, i.e. the fact that in extant life amino acids are left-handed and sugars right-handed¹³.

The emergence of prebiotic compartments can be studied as a phase transition in the thermodynamic sense. Several thresholds that separate phases of dissociated components from self-assembled structures have been identified. Self-assembly thresholds controlling compartments formation can be overcome by varying physico-chemical parameters such as pH, temperature, or molecular crowding. It has been studied for the formation of vesicles³², coacervates³³ or microdomains in liquid crystals³⁴ (figure 1.c). For finite-size structures, such as peptide nanospheres³⁵, mathematical models have established a threshold separating the self-assembled state from a “yield catastrophe phase” where constituents nucleate without stabilizing to final structures, controlled by activation and dimerization rates³⁶.

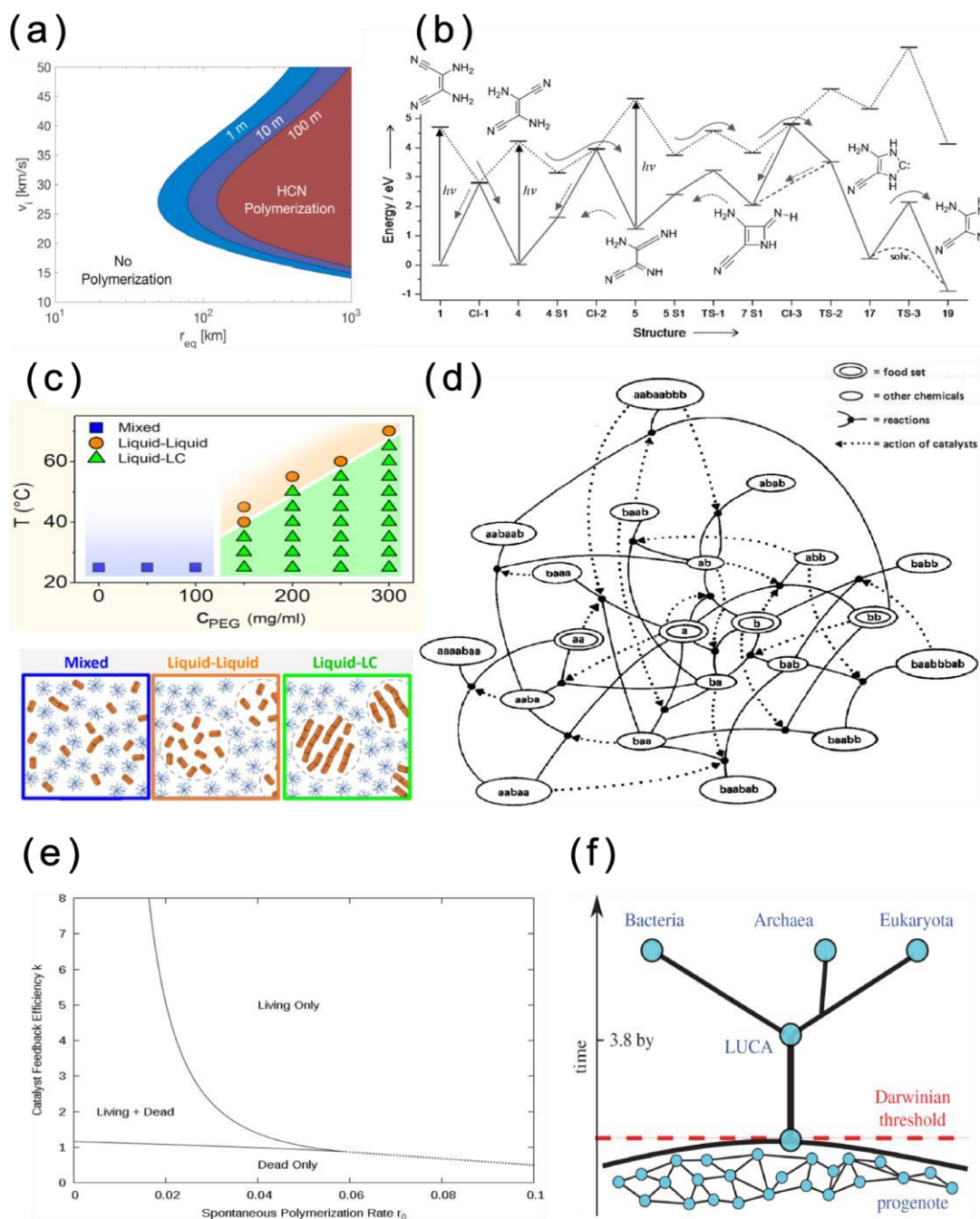


Figure 1. A sample of thresholds in origin of life research. (a) Phase diagram representing necessary conditions for a meteoritic impact to deliver a quantity of HCN above a threshold value of 10 mM (required for its polymerization into nucleobases, assuming an oxidizing early Earth atmosphere). Diagram obtained by mathematical modelling; meteorite radius represented on the x-axis; impact velocity on the y-axis; several mixing depths below water surface are represented (from Parkos et al. ²⁵ with permission). (b) Diagram of the photoactivated reactions from cis-DAMN to AICN compounds which are key intermediates in the prebiotic synthesis of purine nucleotides. Ground and excited states respectively represented in solid and dotted lines; dashed arrows indicate backward reactions. This pathway reveals different free-energy barriers of at least 52 kcal/mol that can be overcome thanks to light energy (from Boulanger et al. ²⁶ with permission). (c) Liquid-crystal phase diagram delimiting 3 areas: a homogeneous phase of mixed RNA and polyethylene glycol (PEG) (in blue), a liquid-liquid phase separation of RNA-rich droplets in PEG solution (in orange) and a liquid-liquid crystals (LC) microdomains phase separation (in green). Going from one area to another is made possible by varying temperature or molecular crowding (i.e. PEG concentration) (from Todisco et al. ³⁴ with permission). (d) Graph describing an autocatalytic set of theoretical polymers that has reached catalytic closure (threshold). The reactions are represented by nodes connecting reactants and products of ligation and cleavage reactions. Dashed lines indicate catalysis and point from catalyst to catalyzed reaction (from Farmer et al. ³⁷ with permission). (e) Phase diagram for an RNA polymerization model as a function of catalyst feedback efficiency k and spontaneous polymerization rate r_0 . So called “dead” state characterized by slow spontaneous rate of RNA synthesis, “living” state by rapid autocatalytic rate of RNA synthesis (from Wu and Higgs ³⁸ with permission). (f) Diagram representing the conjectured transition from a state of progenote cells (genetic transfer mainly achieved horizontally) to a state of speciated individuals (lineages resulting from vertical genetic transfer). Passed the Darwinian Threshold, individuals go from a communal evolution to a Darwinian evolution. Such a transition can be triggered by a decreased competence initiated by environmental parameters or selected mutations (from Goldenfeld, Biancalani and Jafarpour ¹⁷ with permission).

Transitions toward self-organization in reaction networks require the spontaneous formation of autocatalytic networks ³⁹ (figure 1.d). A first threshold concerns catalytic closure, initially formulated for a model of networks of ligation and fragmentation reactions between peptides ¹⁵. Catalytic closure implies the existence of a set of peptides such that the formation of any member of the set is catalyzed by another member of the set. In this model, the transition happens when $\frac{E}{N} > \frac{1}{2}$, with E being the number of catalyzed reactions and N the number of peptides (respectively edges and nodes of the network) ⁴⁰. Other models have simulated autocatalytic transitions in the context of template-based replication ^{41,42}. Wu et al. for instance examined how variations in catalytic feedback efficiency and spontaneous polymerization rate could induce the crossing of a threshold delimiting a regime of slow spontaneous RNA synthesis from a regime of rapid autocatalytic RNA synthesis (figure 1.e). This transition is stochastic, meaning that the systems explore random chemical compositions in a fixed environment before undergoing the transition.

Once formed, autocatalytic networks need to be sustained. For this, catalysts within autocatalytic networks should exhibit high enough specificity towards the reactions of the network to overcome degradation and losses due to side reactions. Given an autocatalytic set of p reactions, each catalyzed with a specificity s_i (where $i = 0, \dots, p$), disappearance can be

avoided provided $\prod_{i=1...p} S_i > \frac{1}{2}$, thereupon revealing a “decay threshold”^{14,43,44}. Furthermore, for survival to be possible, the concentration of feedstock compounds must stay above a specific value most of the time. For a single autocatalytic reaction, this condition is fulfilled if $R > \frac{a}{k}$, with R being the concentration of reactants, a the degradation kinetic coefficient of the autocatalyst and k the kinetic rate of autocatalyst production⁴⁵.

Later stages in origin of life concern the emergence of template-based replication of genetic polymers, which is discussed in detail in the next section, and the emergence of protocells. Early compartments and genetic polymers may not have been strictly associated in lineages.

Indeed, compartments provide a way for multilevel selection⁴⁶ even when genes are submitted to pooling and mixing⁴⁷. The “progenote stage” has been described as a stage where genes heavily exchange between dividing protocells via horizontal gene transfer (HGT)⁴⁸. The transition from dominant HGT to lineages where genetic polymers and compartments are strongly correlated has been coined the “Darwinian threshold”⁴⁹ (figure 1.f). Mathematical models^{17,50} show that such a threshold can be crossed when the progenotes HGT rate decreases below a specific value. This decrease might result from mutations and environmental changes such as protocell density, alkaline shifts, or nutrient limitation^{51,52}. In contrast, other authors posit the advent of Darwinian evolution before the appearance of protocells. This is the case of Eigen’s theory of template-based replication of genetic polymers^{10,53,54}, which we detail in the coming section.

Threshold examples	System state before threshold	System state after threshold	Variables triggering the transition (in model or experiment)	Naturalized variables posited to have triggered the transition in an origin of life scenario
Chirality symmetry breaking 13,55	Racemic state of a solution	Homochiral state of a solution	Enantiomeric excess	Presence of circularly polarized light, stereospecific crystallization, isotopic enantioselective initiators, autocatalysis
Spontaneous polymerization 20,22, ²³	Solution of monomers	Solution of polymers	Concentrations of monomers, chemical activation	Ponds evaporation, freeze-thaw cycle, mineral surfaces, thermophoresis in hydrothermal vents, in situ closure in vesicles

Self-assembly of compartments 32,34	Solution of free constituents	Solution of molecular self-assembled compartments	Concentration of the constituents, salinity, pH, temperature, molecular crowding	Increase of CO ₂ concentration, day/night temperature variations, wet-dry cycles
Catalytic closure threshold 15	Solution of polymers with few catalysts	Closed collective autocatalytic sets	Number of catalysts and reactions catalyzed	Spontaneous and effective synthesis of diverse polymers
Error threshold 10,12	Unreplicated polymers	Polymers copied by template-based replication	Selective advantage, copying error rate, polymers length	Selection of compartments, genotype-phenotype redundancy, mineral surfaces
Decay threshold 14,43,45	No autocatalysis	Autocatalytic set	Kinetics, network topology, feedstock concentration	Transient depletion in reactants or rare product of preexisting reactions
Darwinian threshold 17,49	Progenotes with high Horizontal Gene Transfer (HGT)	Speciated individuals with high Vertical Gene Transfer	HGT strength (i.e. competence), fitness	Decrease in cell density, nutrient limitation, alkaline shift, toxic chemicals release

Table 1. Examples of thresholds in origin of life scenarios. Systems states before and after crossing the threshold are listed, along with corresponding physico-chemical variables and prebiotically relevant phenomena.

6.3. The error threshold and the replicase

The error-threshold, introduced by Eigen¹⁰, has certainly been the most studied threshold in origin of life theories. We draw here on the main findings to make a case study and highlight the usefulness of studying thresholds, the replicase scenario being reviewed elsewhere^{11,12}. In the RNA world hypothesis, an RNA capable of catalyzing the polymerization of its own sequence as well as others⁵⁶, a generalist *self-replicase*, is regarded as a primordial replicator capable of Darwinian evolution. The appearance and maintenance of such a replicase regime—a process that we will refer to as the “replicase scenario”—is constrained by the error threshold which imposes upper bounds on the length of the copied reference sequences given an error rate during replication. More specifically, to avoid the disappearance of the sequence to be copied

across rounds of replication, called the “error catastrophe”, the following condition must be fulfilled:

$$l \leq \frac{\ln(s)}{e} \quad (1)$$

where e is the replicase copying error rate and s the selective advantage, defined as the ratio of the replication rate of the reference sequence to that of the erroneous sequences. Formula (1) was initially derived by Eigen et al. assuming that a polymerase is present and non-limiting or that replication is non-enzymatic (see next section for more precise models). Formula (1) is valid for $s > 1$, otherwise this model forbids any reference sequence, including the replicase, to be sustainable. From (1), we deduce a function $e_{max} = \frac{\ln(s)}{l}$ (red curve on figure 2.a). Due to the minimum structure complexity required for replicase activity, replicases of a given length l cannot reach perfect fidelity and their error rate must be above a certain value $e_{min}(l)$ (blue curve on figure 2.a). Bounds e_{min} and e_{max} delineate a domain in the space parametrized by (l, e) so that above e_{min} there exist replicases, and under e_{max} , replicase copying can be sustained through faithful replication. If these domains overlap, i.e. if there exists an l such that $e_{max}(l) \geq e_{min}(l)$, then the replicase regime is possible in the intersection domain (green zone in figures 2.a and 2.b; note that the sheer possibility of the replicase regime does not imply its plausibility). Otherwise, $e_{max}(l) < e_{min}(l)$ for all l , and the replicase regime has no existence domain (figure 2.c). The latter case corresponds to “Eigen’s paradox”: no long replicases without replication fidelity, but no fidelity without long replicases.

If the replicase regime is possible, the next step is to study the plausibility of emergence of a sustainable replicase. First needed is the number N_l of sequences of length l that have a replicase activity with an error rate e . The higher this number, the greater the chances of reaching at least one such replicase by a pre-existing generative process. The distribution $f(e, l)$ of these sequences is depicted in figure 2.d for a given length l . Second, the pre-existing generative process also determines the plausibility of the transition. A typical model for this regime is random polymerization, where every sequence is generated with equal probability for a given length. There, the fraction of generated polymers of a certain length $g(l)$ in the polymer population decreases rapidly with l . From the distributions $f(e, l)$ and $g(l)$, we estimate the probability for a sustainable replicase to appear to be:

$$P_r = \sum_l g(l) \int_{e_{min}(l)}^{e_{max}(l)} f(e, l) de \quad (2)$$

This probability can be used in the context of an environmental scenario supplying estimates of the total number N of random oligomers present at any moment, their global renewal rate ρ resulting from sequence generation and destruction dynamics. The typical time t required for one replicase to appear then obeys:

$$\rho t N P_r \sim 1 \quad (3)$$

The parameters found in (2) and (3) highlight the highly interdisciplinary nature of the question: the threshold e_{max} is determined by replication dynamics studied in theoretical biology; the distribution f and threshold e_{min} arise from genotype-to-function relationships obtained from biochemical considerations; g depends on the chemistry of spontaneous polymerization; ρ and N depend on geochemical processes, and t should be compared with estimates from geology and planetary system stability analysis.

The analysis leading to (3) is only part of the answer for the replicase scenario: for the replication dynamics to actually start, a replicase needs to encounter either a copy of its own sequence or a complementary sequence. This should probably take place in a compartmentalized setting, where only replicase sequences are present, since otherwise the copying of other sequences would immediately take over the population. Furthermore, the analysis presented so far may be questioned, given that formula (1-3) rely on a number of strong assumptions. We examine some of these considerations in the coming section.

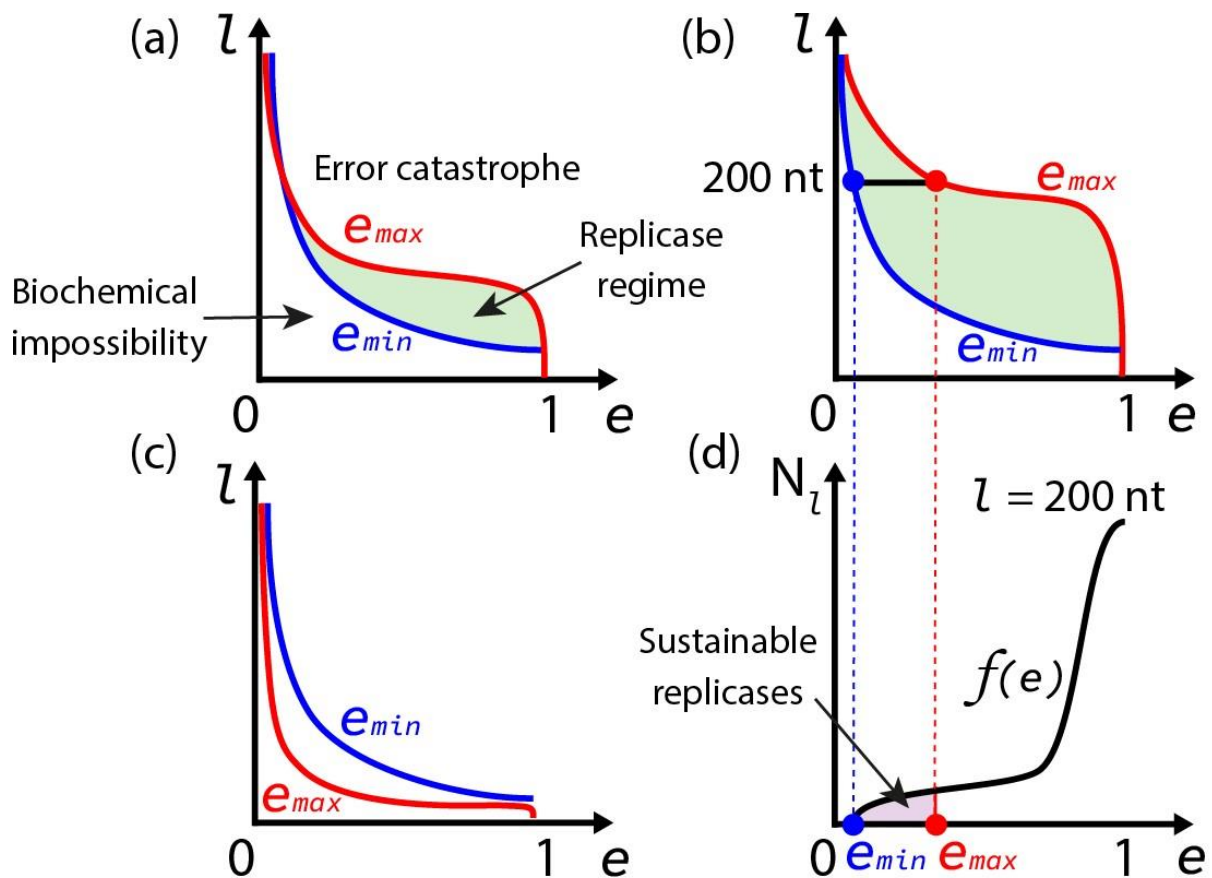


Figure 2. Phase diagrams for the replicase scenario. (a) Phase diagram showing the areas where the replicase regime is possible (green area delimited by the red and blue curves) in the parameter space (e, l) , where e is the error rate of the replicase and l the length of the copied sequences, including the replicase itself. The red curve represents the function e_{max} that sets the maximal replicase error rate e_{max} for each given length l of the copied sequence, and for a given selective advantage (s in equation (1)); it gives the maximal length of copied sequences, for each given error rate e . When e is low enough, $e_{max}(l) \sim \frac{1}{l}$; when e is close to 1, equation (1) is no longer valid and l exponentially tends towards 0¹⁰. Above the red curve, the copied sequences vanish in the error catastrophe. The blue curve represents the function e_{min} that sets the minimal error rate e_{min} a replicase can reach due to

biochemical considerations. As first approximation, higher fidelity needs to be encoded in longer sequences. When e tends towards 1, the blue curve reaches a plateau corresponding to the minimum length that a replicase must have to catalyze a phosphodiester bond between two nucleotides. For a given length, there is no existing replicase under e_{min} . Note that l stands for the length of any copied sequence in the case of the red curve, whereas it only stands for the length of the replicase in the case of the blue curve; the representation of the two lengths on the same graph is possible thanks to the fact that the replicase regime assumes that the replicase is itself subjected to replication as well. The blue and red curves are obtained by merging models and experiments; their shape can therefore change. For example, in **(b)**, the existence zone is wider than in **(a)**. In **(c)**, there is no existence zone at all; as a consequence, the replicase scenario must be revised or abandoned in this case. Figure **(d)** represents the distribution f , i.e. the number of available replicases as a function of their copying error rate (at a given illustrative length of 200 nucleotides, as in **(b)**). The purple zone bounded between e_{min} and e_{max} depicts the total number of possible sustainable replicases.

6.4. Refining and revising the replicase scenario

The error threshold of equation (1) relies on a number of simplifying assumptions that have been refined in subsequent models presented here. Such models may lead to lower e_{max} , thus reducing the size of the green zone in figure 3, which goes to the detriment of the replicase scenario. For instance, Eigen's original model ignores the effects of changes in replicase concentration, whereas the latter is impacted by replication. Including this aspect greatly lowers e_{max} ⁵⁷. Experimental data about RNA replication highlight another required model revision, because replication errors typically lead to shorter sequences rather than to point mutations⁵⁸. As a result, mutants tend to replicate faster than the original sequence, which means $s < 1$ by definition of the selective advantage, so that replicase regimes cannot be sustained (see Section 2). Note however that it is still unclear whether results obtained with protein replicases used in these experiments extrapolate to hypothetical RNA replicases. In contrast, other model refinements tend to increase e_{max} , thus broadening the range of viable replicases. This is the case when considering the abundance of neutral mutations in the neighborhood of the replicase sequence, leading to a "relaxed" error threshold which is significantly lower than Eigen's^{59,60}.

Other modifications also imply a revision of the scenario. So-called "hypercycles" were first proposed as a way to increase the robustness of the system to replication errors⁵³. This model is based on a network with multiple molecular species, each species being replicated in a template-based manner while helping the replication of other members of the network. The resulting cooperative dynamics can raise the error threshold, thereby increasing the replicase regime zone¹². Other scenarios introduce compartments and more generally spatial structure. The Stochastic Corrector Model (SCM) considers lineages of compartments which grow, are selected, and divide^{61,62}. Transient Compartmentalization (TC) assumes simpler cycles consisting of compartmentalization, selection, and pooling^{47,63}. Unlike the original model and its equation (1), SCM and TC authorize the presence of parasite sequences that replicate faster than the reference sequence. This was experimentally demonstrated for TC with replicated RNA⁴⁷. Indeed, in both cases, erroneous copies only locally invade compartments and are removed from the population by compartment-level selection. Surface clusters are an even less constrained setting that allows the maintenance of replication, although less efficiently than non-permeable compartments^{64,65}. These mechanisms increase e_{max} thereby also the

plausibility of the replicase scenario. However, this comes at the cost of assuming the existence of spatial structures and introducing additional parameters (number of molecules per compartment, compartment lifetime, selection process, etc.).

Once the error threshold is determined, the next question is to estimate the fraction of viable replicases in the sequence space. This corresponds to determining the distribution f in equation (2), which depends on the relationship between sequence and catalytic function, including the minimum possible error rate e_{min} given a certain replicase length. This problem cannot be solved computationally yet, and heavily relies on experimental data. Experiments on synthetic replicases show that processivity — the ability to copy long templates — is a limiting factor even before considering fidelity. Processivity is notably hampered when copying folded RNAs, which is the case for replicase templates. Consistently, replicases synthesized in the laboratory can copy other RNAs as long as themselves but cannot copy themselves^{66,67}. Another issue is that the sequence space cannot be covered experimentally due to its astronomical size ($\sim 10^{114}$ for a typical 190 nucleotides long replicase⁶⁸). Consequently, experimental data need to be combined with theory and computation in order to estimate f . For instance, the diversity of

RNA secondary structures is predicted to increase as $1.4848 \times n^{-\frac{3}{2}}(1.8488)^n$ where n is the sequence length⁶⁹. This is consistently smaller than the 4^n possible sequences. Taking structure similarity as a proxy for function indicates an average redundancy in sequences with similar catalytic properties, thereby potentially reducing the size of the space to characterize. A complementary approach is to estimate the tail of distribution f between e_{min} and e_{max} (figure 2.d) using laws of extreme statistics⁷⁰. Indeed, replicases are rare sequences for which statistics are expected to follow extreme value theory. The latter restricts distributions of rare properties to functional forms (among the Weibull, Gumbel and Fréchet laws) with few parameters. Such approach has been tested experimentally for proteins⁷¹ and ribozymes⁷². Despite the complexity of the genotype-to-phenotype relationship, the limited number of parameters involved in these laws may allow estimates of f from a restricted sample of replicases.

Finally, the transition scenario toward existence of a sustainable replicase may be revised by considering different polymer generation processes anterior to the replicase regime. Polymer generation could have been enhanced by catalysis of polymerization³⁰, ligation⁷³, or recombination⁷⁴, as well as by size selection⁷⁵. An alternative is that autocatalytic sets may have preceded template-based replication and biased polymer populations toward longer and more functional sequences⁴³. All these processes can add weight to the distribution g in equation (2) in the length categories corresponding to replicases and contribute to the plausibility of their emergence.

6.5. Generalizing the threshold approach

We have seen that the error threshold sets a number of requirements on polymerases for them to sustain replication. We now generalize the threshold approach to other properties of prebiotic systems. In figure 3, the axes correspond to relevant parameters of the system and its

environment, and regions α and β respectively correspond to systems without and with a property of interest (regions separated by a threshold line). We call this representation a phase diagram, by analogy with equilibrium thermodynamics, extending its use to non-equilibrium regimes as well. In the replicase scenario, region α corresponds to a regime of randomly produced RNAs and region β to sustainable template-based RNA replication, the boundary between the two being the error threshold. In contrast with figure 2 where the axes stand for system parameters only, the x-axis in figure 3 captures system parameters (e.g. replicase error rate) and the y-axis environment variables (e.g. temperature). Note that it is not always obvious to distinguish prebiotic systems from their environment, and choosing a variable as being either part of the system or of the environment may be a matter of choice. Note also that the x-axis represents chosen control parameters of the system; other parameters of the system may lie in other dimensions, in particular as encoded by the green shading of β in figure 3, which indicates the presence of a specific property of the system. A point in the diagram then represents a system with certain fixed properties in a given environment. Such phase diagrams allow us to classify modes by which a system overcomes a threshold and acquires a novel property, i.e. moves from region α to region β . We classify transitions into four modes:

1. *Extrinsic transition*: the acquisition of a new property is here solely driven by the environment. In figure 3a, the system is initially located at point A in region α and environment E_1 ; a change from E_1 to E_2 brings the system to B in region β . Since this transition is not caused by any change in the system control parameters, there is no variation along the x-axis. Transitions in prebiotic chemistry are typically framed in the context of extrinsic transitions^{76–78}, where concentration thresholds are overcome during wet-dry cycles in ponds⁷⁹, where steps of nucleobase synthesis occur at the junction of interconnecting streams⁸⁰, or where hydrogen cyanide is synthesized upon meteorite impacts²⁵. This mode can also be applied to the appearance of vesicles triggered by CO_2 ³².

2. *Intrinsic transition*: the novel property here results from changes in parameters of the system while the environment remains unchanged. In figure 3.b, the system is initially located at point A in α with environment E_1 , and moves to B in β without any environmental change, simply moving along the x-axis. This is the case when a replicase appears from random polymerization as described in section 3⁴². Another example is the appearance of autocatalytic sets as modelled by Jain and Krishna⁸¹. This model assumes that catalytic species only are limiting and follow a dynamic where the least fit species tend to disappear and be randomly replaced by novel catalytic species. Under these assumptions, an autocatalytic set inevitably emerges and fixes. Note that in the examples cited above, extrinsic transitions are deterministic while intrinsic transitions are stochastic, but this need not always be the case. For a related discussion on contingency versus determinism in the framework of the origin of life see Luisi⁸².

3. *Scaffolding transition*: the environment changes only transiently, and fixing a novel property requires to combine the environmental change with a system-driven change. Here, the environment plays the role of a scaffold in the sense that it transiently supports the emergence of a property which is then internalized, i.e. becomes an intrinsic property of the system⁸³. In figure 3c, the system starts at point A in region α in environment E_1 , then moves to point B in

region β via an extrinsic transition triggered by an environmental change to E_2 . At this stage, returning to E_1 would bring the system back into α . However, if the property acquired in β allows the exploration of neighboring areas along the x-axis, the system may reach B' in β while in environment E_2 . Then, an environmental change from E_2 back to E_1 would bring the system from B' to B'' , yet still within β . Such scaffolding transition could be observed when a dilute solution of polymers in a pond (system in A) is submitted to partial evaporation (from E_1 to E_2), thereby reaching a concentration threshold above which autocatalysis becomes possible (system in B), leading it to accumulate enough catalysts (from B to B') so that once back to wet conditions, autocatalysis is maintained (from B' to B'').

4. *Symbiotic transition*: two distinct systems aggregate into a new system thereby acquiring a novel property. In figure 3.d, systems A and B both in α merge into a new system C located in β in a constant environment. Such transition is hypothesized when compartments meet autocatalytic chemistries^{84,85}. Both may pre-exist separately, but evolution by natural selection requires autocatalytic chemistries to be compartmentalized in order to provide a collective level of selection⁴³.

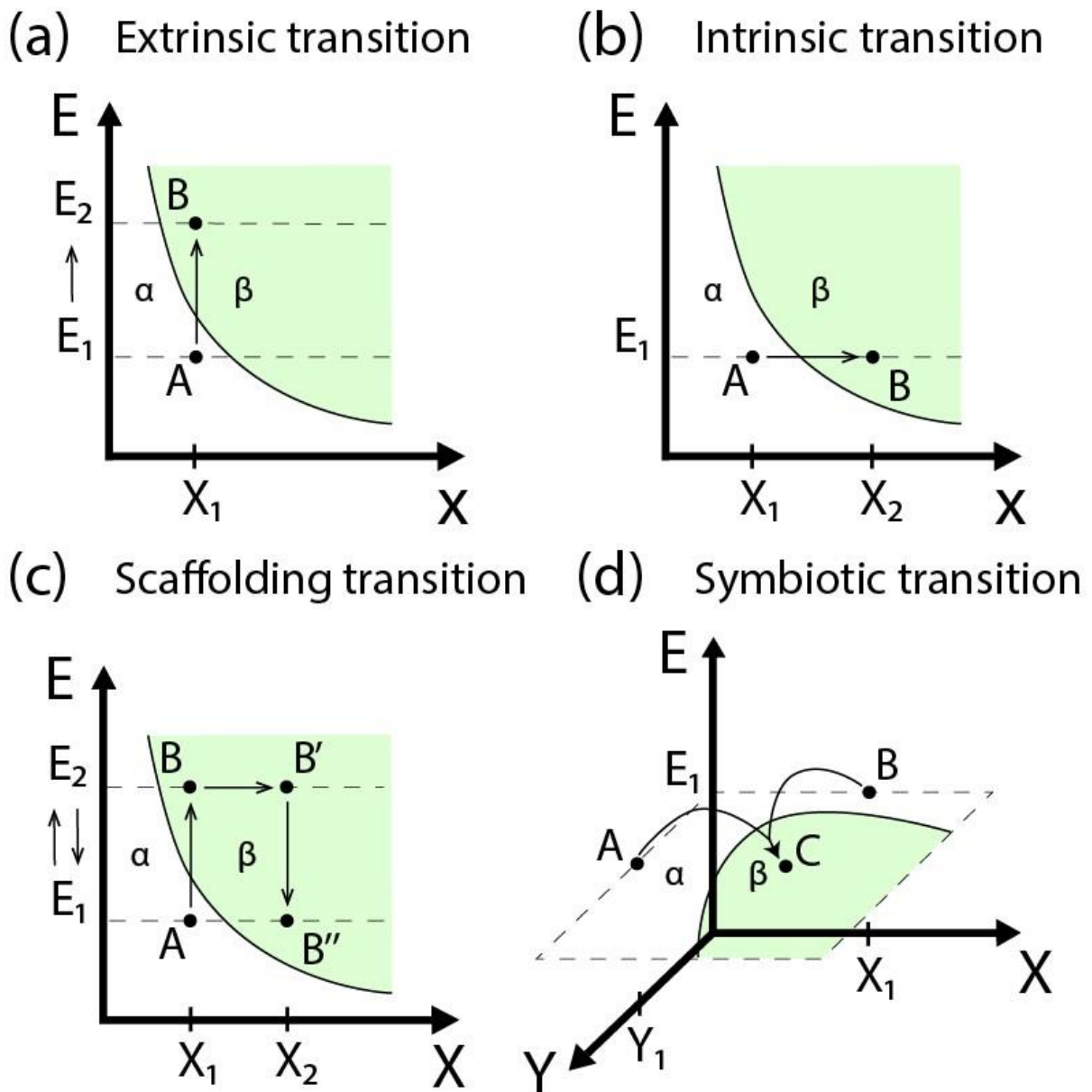


Figure 3. Different ways of crossing thresholds. The y-axis represents a relevant environmental variable whereas the x-axis represents a variable of the system itself, in (a), (b) and (c). The phase diagrams are divided in two: a green region β where the system displays a specific property p and a region α where it does not. (a) The system, initially in point A, acquires the property p in point B thanks to an environmental change from E_1 to E_2 , i.e. via an extrinsic transition. Vesicle formation from a micellar solution can be so described, where E would be for instance the concentration of dissolved CO_2 ³². (b) The system undergoes a transition from A to B because of an internal variation of the system, in a given environment, i.e. via an intrinsic transition. Stochastic transitions from random polymerization to replicating polymers fit in this representation, where X could describe the diversity of generated polymers⁴². (c) The system acquires p (from A to B) thanks to an environmental change. It keeps this property in B'' while the environmental variable goes back to its initial value E_1 . This is made possible thanks to a transitory change of a variable of the system itself in environment E_2 (from B to B'). For instance, the property p could be the ability to sustain an autocatalytic network, the transient environmental change the shift between dry and rainy periods, and the transition from B to B' the accumulation of autocatalysts. The y-variable would then be environmental hygrometry and the xvariable catalyst concentration. (d) Here, two independent systems in A and B fuse into a single one in C that displays p , in environment E_1 . This is the case when autocatalytic networks get encapsulated in compartments, endowing the novel system with the property to evolve through natural selection⁴³.

6.6. Articulating series of thresholds

In previous sections, we analyzed single threshold transitions. However, origin of life scenarios combine multiple transitions^{5,8}. There are to date only a few attempts to assemble complete detailed scenarios⁸⁶⁻⁸⁸. Research efforts have focused on combining transitions for specific stages, such as the synthesis of building blocks^{77,80,89}, the emergence of functional RNAs from random ones^{90,91} or the emergence of evolution from catalytic micelles⁹², to cite a few. Below, we apply the phase diagram representation to multiple thresholds. This analysis reveals different types of articulations between threshold transitions: *accumulation*, *entrenchment*, *contingency*, *transience*, *facilitation*. These concepts are borrowed from evolutionary biology but are used here to analyze systems that do not necessarily evolve in a Darwinian manner. We indeed consider these concepts to be generally applicable to successions of threshold transitions, heritable transitions through Darwinian evolution only being a particular case.

We first consider the crossing of two successive thresholds. In figures 4.a-c, the green and blue regions β and γ indicate systems which possess properties p_β and p_γ , respectively; in region α , the system does not possess any of them. Here, the x- and y-axes depict relevant variables that can be environmental, systemic or both. For *accumulation* of properties p_β and p_γ to be possible, regions β and γ must intersect. Figures 4a-c depict systems that start from region α , then cross the threshold leading to β , followed by a second threshold-crossing to region γ . A notion stronger than accumulation is *entrenchment*, where any property p_γ posterior to p_β requires it and fixes it irreversibly. This is illustrated in figure 4a, where region γ is entirely included in region β . For example, p_β could stand for the existence of catalytic RNAs and p_γ of autocatalytic RNAs. Another threshold articulation is when β and γ intersect without inclusion. Such a situation is characterized by *contingency* in the sense that p_γ may exist independently of p_β (and vice-versa) so that any of the two properties may appear first (figure 4.b, from points A to B or points A to b). This would be the case with the appearance of RNAs (p_γ) together with other genetic polymers (p_β)⁹³. Alternative polymers further illustrate *transience*, where a property is acquired, and then lost (figure 4.b, any path from point A to point D). For instance, TNA may have appeared, coexisted with RNA, then disappeared⁹⁴. Finally, a threshold transition can make a subsequent transition more plausible when acquiring p_β lowers the threshold to acquire p_γ (figure 4.c); this is referred to as *facilitation*. For example, compartmentalization (p_β) lowers the error threshold that delineates sustainable replication (p_γ)⁴⁷.

We now consider the articulation between more than two thresholds as depicted in figure 4.d as a Venn diagram, where thresholds delineate regions corresponding to different properties. For example, a chemical system may start in region α where it has the ability to synthesize random RNAs. By reaching β , it gains the ability to synthesize random peptides as well. Next, reaching γ allows autocatalysis among sets of peptides. Furthermore, in these examples, the system is allowed to *accumulate* the properties that define α , β and γ because they all intersect. An example of *entrenchment* here is RNA oligomer synthesis (α) that is a necessary condition for

the existence of autocatalysis in RNA sets (δ is fully included in α). *Transience* happens if the system loses its ability to synthesize random RNAs (α) but acquires protein RNA-replicases (φ), as it allows replication of long RNAs from single nucleotides.

The notion of *entrenchment* can be further refined. As we have seen, it occurs when a system cannot get rid of a feature because too many things have evolved on that basis. As a result the entrenched feature can narrow down the access to other properties as well as open other possibilities. The former is known as “contingent irreversibility”⁷ and the latter as “generative entrenchment”⁹⁵ or “enabling constraint”⁹⁶. In figure 4.d, reaching region δ allows transition to region ε but not φ . The advent of homochirality illustrates these notions. Indeed, a racemic mixture of oligonucleotides (region β in figure 4.d) could break its symmetry because of a triggered small enantiomeric excess amplified by an autocatalytic reaction leading either to L-ribose RNA only (region γ) either to D-ribose RNA only (region δ)¹³. Entrenchment would follow with peptide synthesis: L-ribose RNA systems could imply D-amino acids peptides only (region φ) whereas D-ribose RNA systems could imply L-amino acids peptides only (region ε)⁹⁷.

Finally, we relate the diagram representations to the concept of *liveness* (also referred as *aliveness* or *life index*) proposed by several authors^{98–100}. Liveness stands for a scale where so-called “infrabiological systems”¹⁰¹ are positioned between a non-living state and a living state. It remains unclear which quantities or measures best account for liveness. For instance, Bedau¹⁰² proposes a discrete scale from 0 to 9 depending on the number of interactions between three subsystems: container, metabolism and program, while Malaterre and Chartier (2019) propose a multidimensional gradual scale that integrates a system’s internal and environment-related functions as derived from the data-mining of large scientific corpora. In any case, projecting the paths of figure 4d on any such measure would make threshold transitions appear as jumps, the directionality of paths towards a living state corresponding to increasing liveness (figure 4.e). In this view, we propose that liveness corresponds, at first order, to the number of thresholds crossed relative to the total number of thresholds in a given scenario. This suggests a way toward formalizing the notion of chemical evolution: early prebiotic systems may not yet evolve in a canonically Darwinian manner, but in the sense of acquiring and sustaining qualitatively novel properties by crossing thresholds, thereby increasing their liveness before getting a chance to increasing their fitness.

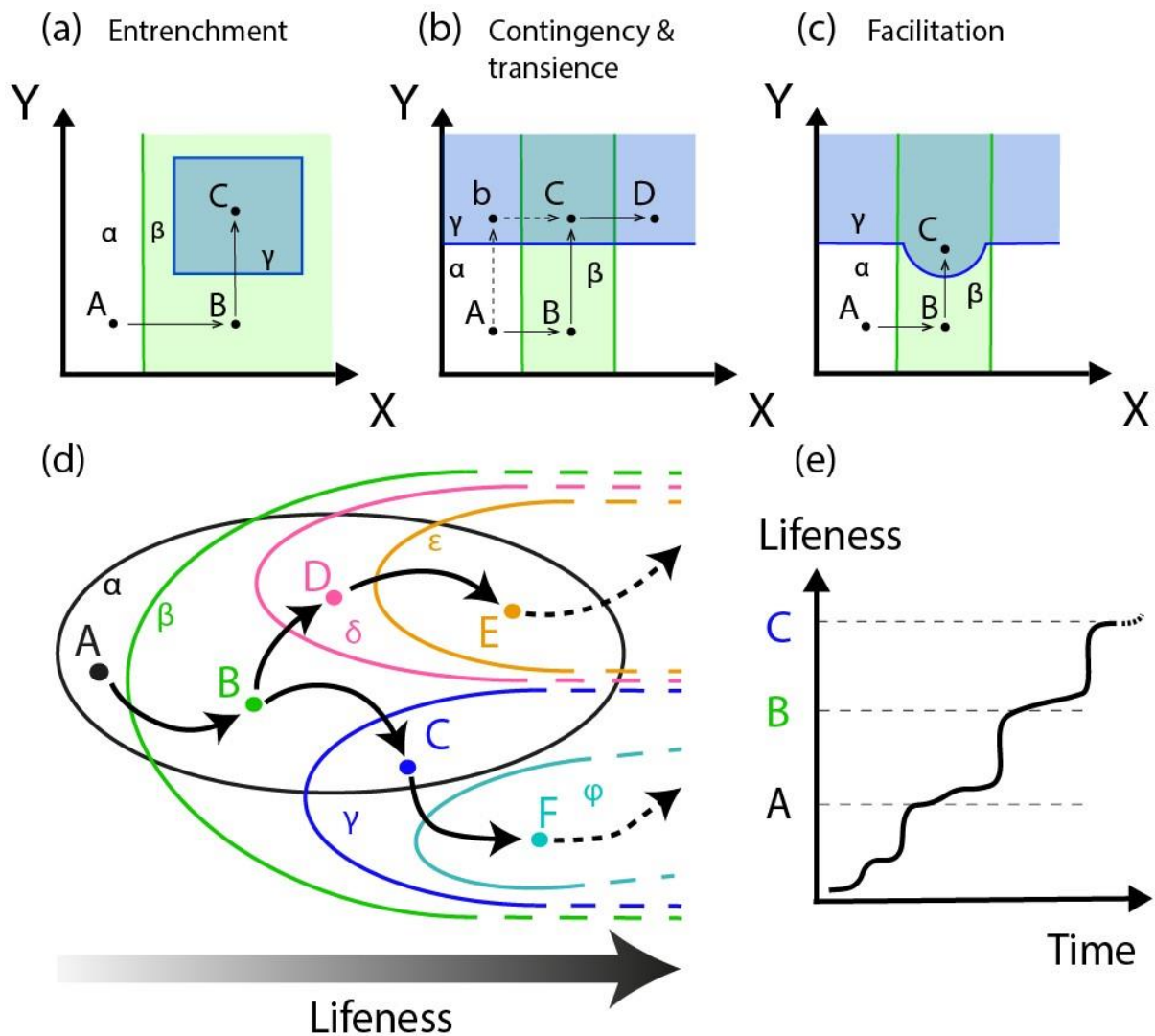


Figure 4. Articulating different thresholds. Figures (a), (b) and (c) represent combinations of two phase-diagrams, with x- and y-axes describing relevant systemic and environmental variables (the representation is simplified to fit a 2D illustration). The green region β and the blue region γ represent two regions where properties p_β and p_γ can be acquired respectively. The arrows show different ways to cross a succession of two thresholds. **(a) Entrenchment.** Region γ is included into region β so that the system must acquire p_β before acquiring p_γ . In this configuration, p_β could stand for the ability to generate random polymers and p_γ for the property of having an autocatalytic set of polymers ⁴². **(b) Contingency and transience.** Region γ partially intercepts region β so that the system can combine p_β and p_γ in C by first acquiring either one of the two properties. Here p_β and p_γ could stand for the ability to generate one type of genetic polymer or the other. The system in C would therefore generate both types of polymers at the same time, such as RNA and TNA. Transition from C to D, through a second threshold, shows that a specific property can be lost across phase transitions. It could be the loss of TNA that is not present in the actual living world ⁹³. **(c) Facilitation.** Getting p_β first lowers the threshold delineating p_γ . This is the case when compartmentalization (p_β) raises the error-threshold of a replicating system (p_γ) making it more likely to appear ⁴⁷. **(d) This Venn diagram** shows different ways of crossing a series of thresholds. Colored edges represent thresholds that delimit domains with novel properties. Each domain is denoted with a Greek letter. Points denoted with a capital Latin letter stand for a given system state. Arrows between points represent possible trajectories of a prebiotic system across successive domains. The figure exhibits contingency (the system can reach C or D from B), enabling constraint (the system in D can reach F but not E), accumulation (the system in C has accumulated properties gained in A and B), entrenchment (the property acquired in B remains in all other locations)

and transience (the system in F has lost the property acquired in A). (e) This graph illustrates how crossing successions of thresholds may account for an increase in liveness over time.

6.7. Discussion

Thresholds define conditions of existence for particular states along the path from inanimate matter to life. Although not all prebiotic transitions are threshold transitions, thresholds pose well-defined problems that can structure interdisciplinary efforts to understand the origin of life (Fig. 5). Thresholds may initially be deduced from apparent paradoxes, so-called “catch-22” or “chicken-and-egg” situations stated as: “without X, no Y, and without Y, no X”¹⁰³. For instance, from a bird’s-eye view of life, metabolism, genetics and compartments appear so intertwined that there is no obvious scenario for their gradual emergence. As we have seen, thresholds are also detected when taking a closer look at molecular processes, such as templatebased replication, or from computer simulations and experiments. Their signatures are discontinuities, hysteresis and waiting time distributions, as observed with first order phase transitions in physics.

Quantitatively characterizing a threshold requires back-and-forth adjustments between theory and experiment. Interestingly, thresholds pose conditions of existence of a given state without referring to an anterior nor a posterior state. Thus, their study is independent of a particular transition or scenario in the first place. The starting point is typically a simplified model establishing relationships between parameters. Such a “toy-model” has been highly productive in the case of the error threshold, notably pointing to the disciplinary diversity of its parameters. From this point, thorough theoretical investigations of the parameter space and regimes help elaborating hypotheses testable with synthetic experiments in chemistry, systems chemistry, physico-chemistry, soft matter physics, etc.^{5,9}. In turn, models may be refined until convergence. A possible outcome is that the proposed regime is impossible due to multiple incompatible thresholds, resulting in a true paradox and the revision of the scenario with alternative regimes. Otherwise, the regime is possible and then comes the question of its plausibility.

To assess plausibility, transition from an anterior state must be accounted for^{104,105}. Theory, possibly again with back-and-forth adjustment with experiments, estimates the probability of crossing the threshold given the anterior state and environmental conditions as determined by geology, geochemistry, or planetary dynamics among others^{106,107}. Comparing the crossing probability from different anterior states and environments selects between transitions (e.g. random polymerization or autocatalytic sets before to template-based replication). The plausibility of scenarios finally results from the probability of successions of such transitions. If this total probability is deemed too low, alternative scenarios may lead to consider novel thresholds (e.g. error thresholds with compartment instead of without).

So far, no one agrees whether any scenario is actually devoid of true paradoxes (impossibilities). However, the threshold approach outlined above can establish firm building blocks on the way to constructing scenarios. For this to be effective, studies on the origin of life must be explicit with the thresholds they address, the parameters involved, and the relationships between these parameters, following the example of the error threshold.

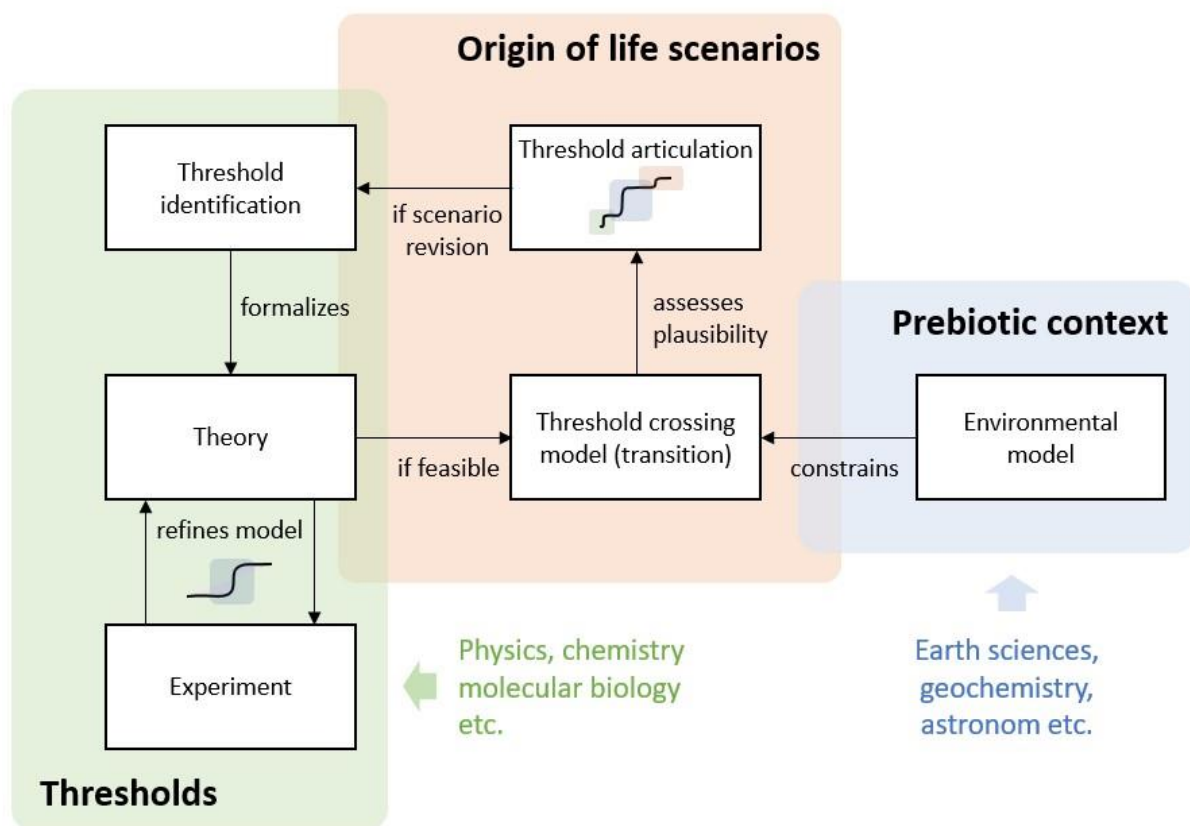


Figure 5. Threshold transitions in origin of life research. Identifying a threshold in an origin of life scenario allows the formalization of a parametrized theoretical model. This model can be refined by the output of appropriate experiments, which reciprocally benefit from a refinement of the theoretical model. These back-and-forth relations make it possible to refine the threshold model. The parameters of the threshold model help to integrate several disciplines among which physics, chemistry or molecular biology. If the threshold is such that the transition from one state to another is possible, it can be used as a basis for modelling such a transition within a broader scenario for the transition from non-living to living matter. Transition possibilities are then constrained by hypothesized environments as determined by Earth sciences, geochemistry, astronomy etc. Plausibility estimates of such transitions allow one to build and estimate multi-stage scenarios articulated around well-identified thresholds. If a scenario reaches a dead-end, it needs to be revised and novel thresholds identified.

References

1. Oparin AI. *The Origin of Life*. New-York: Macmillan Publishers Limited; 1938.
2. de Duve C. *Blueprint for a Cell : The Nature and Origin of Life*. Burlington: Patterson; 1991.
3. Eschenmoser A, Loewenthal E. Chemistry of Potentially Prebiological Natural Products. *Chem Soc Rev*. 1991;67(281):1-16.
4. Rimmer PB, Xu J, Thompson SJ, Gillen E, Sutherland JD, Queloiz D. The origin of RNA precursors on exoplanets. *Sci Adv*. 2018;4(8):1-12.
doi:10.1126/sciadv.aar3302
5. Solé R. Synthetic transitions: Towards a new synthesis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2016;371(1701). doi:10.1098/rstb.2015.0438
6. Attwater J, Holliger P. A synthetic approach to abiogenesis. *Nat Methods*. 2014;11(5):495-498. doi:10.1038/nmeth.2893
7. Smith JM, Szathmáry E. *The Major Transitions in Evolution*. Oxford: Oxford University Press; 1995.
8. Szathmáry E. Toward major evolutionary transitions theory 2.0. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(33):10104-10111. doi:10.1073/pnas.1421398112
9. Preiner M, Asche S, Becker S, et al. The future of origin of life research: bridging decades-old divisions. *Life*. 2019;10(20). doi:10.3390/life10030020
10. Eigen M. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften*. 1971;58(10):465-523.
doi:10.1007/BF00623322
11. Kun Á, Szilágyi A, Könnyu B, Boza G, Zachar I, Szathmáry E. The dynamics of the RNA world: Insights and challenges. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1341(1):75-95.
doi:10.1111/nyas.12700
12. Takeuchi N, Hogeweg P, Kaneko K. Conceptualizing the origin of life in terms of evolution. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci*. 2017;375(2109):1-10.
doi:10.1098/rsta.2016.0346
13. Hawbaker NA, Blackmond DG. Energy threshold for chiral symmetry breaking in molecular self-replication. *Nat Chem*. 2019;11(10):957-962.
doi:10.1038/s41557019-0321-y
14. Szathmáry E. The origin of replicators and reproducers. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2006;361(1474):1761-1776. doi:10.1098/rstb.2006.1912
15. Kauffman SA. Autocatalytic sets of proteins. *J Theor Biol*. 1986;119(1):1-24.
doi:10.1016/S0022-5193(86)80047-9
16. Hargreaves WR, Mulvihill SJ, Deamer DW. Synthesis of phospholipids and membranes in prebiotic conditions. *Nature*. 1977;266(5597):78-80.
doi:10.1038/266078a0
17. Goldenfeld N, Biancalani T, Jafarpour F. Universal biology and the statistical mechanics of early life. *Philos Trans R Soc A*. 2017;375(2109).
doi:10.1098/rsta.2016.0341

18. Luisi PL, Stano P, de Souza T. Spontaneous Overcrowding in Liposomes as Possible Origin of Metabolism. *Orig Life Evol Biosph.* 2014;44(4):313-317. doi:10.1007/s11084-014-9387-0
19. Nelson KE, Robertson MP, Levy M, Miller S. Concentration by Evaporation and the prebiotic Synthesis of Cytosine. *Orig Life Evol Biosph.* 2001;31(3):221-229. doi:10.1023/A:1016582308525
20. Monnard PA, Kanavarioti A, Deamer DW. Eutectic Phase Polymerization of Activated Ribonucleotide Mixtures Yields Quasi-Equimolar Incorporation of Purine and Pyrimidine Nucleobases. *J Am Chem Soc.* 2003;125(45):13734-13740. doi:10.1021/ja036465h
21. Trinks H, Schröder W, Biebricher CK. Ice and the origin of life. *Orig Life Evol Biosph.* 2005;35(5):429-445. doi:10.1007/s11084-005-5009-1
22. Lambert JF. Adsorption and polymerization of amino acids on mineral surfaces: A review. *Orig Life Evol Biosph.* 2008;38(3):211-242. doi:10.1007/s11084-0089128-3
23. Baaske P, Weinert FM, Duhr S, Lemke KH, Russell MJ, Braun D. Extreme accumulation of nucleotides in simulated hydrothermal pore systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(22):9346-9351. doi:10.1073/pnas.0609592104
24. Miyakawa S, Cleaves HJ, Miller SL. the Cold Origin of Life : Hydrogen Cyanide and Formamide. *Orig Life Evol Biosph.* 2002;32(1986):195-208.
25. Parkos D, Pikus A, Alexeenko A, Melosh HJ. HCN Production via Impact Ejecta Reentry During the Late Heavy Bombardment. *J Geophys Res Planets.* 2018;123(4):892-909. doi:10.1002/2017JE005393
26. Boulanger E, Anoop A, Nachtigallova D, Thiel W, Barbatti M. Photochemical Steps in the Prebiotic Synthesis of Purine Precursors from HCN. *Angew Chemie.* 2013;125(31):8158-8161. doi:10.1002/ange.201303246
27. Miller SL. A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science.* 1953;117(3046):528-529. doi:10.1126/science.117.3046.528
28. Dickson KS, Burns CM, Richardson JP. Determination of the free-energy change for repair of a DNA phosphodiester bond. *J Biol Chem.* 2000;275(21):15828-15831. doi:10.1074/jbc.M910044199
29. Wachowius F, Holliger P. Non-Enzymatic Assembly of a Minimized RNA Polymerase Ribozyme. *ChemSystemsChem.* 2019;1(1-2):12-15. doi:10.1002/syst.201900004
30. Hazen RM, Sverjensky DA. Mineral Surfaces, Geochemical Complexities, and the Origins of Life. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a002162. doi:10.1016/0169-5347(88)90031-6
31. Pascal R. Suitable energetic conditions for dynamic chemical complexity and the living state. *J Syst Chem.* 2012;3(1):1-5. doi:10.1186/1759-2208-3-3
32. Bachmann PA, Luigi P, Lang J. Autocatalytic self replicating Micelles As Models for Prebiotic Structures. *Nature.* 1992;357(May):1013-1015.

33. Jiang H, Wang S, Huang Y, et al. Phase Transition of Spindle-Associated Protein Regulate Spindle Apparatus Assembly. *Cell*. 2015;163(1):108-122. doi:10.1016/j.cell.2015.08.010
34. Todisco M, Fraccia TP, Smith GP, et al. Nonenzymatic Polymerization into Long Linear RNA Templated by Liquid Crystal Self-Assembly. *ACS Nano*. 2018;12(10):9750-9762. doi:10.1021/acsnano.8b05821
35. Carny O, Gazit E. A model for the role of short self-assembled peptides in the very early stages of the origin of life. *FASEB J*. 2005;19(9):1051-1055. doi:10.1096/fj.04-3256hyp
36. Gartner FM, Graf IR, Wilke P, Geiger PM, Frey E. Stochastic yield catastrophes and robustness in self-assembly. *Elife*. 2020;9. doi:10.7554/elife.51020
37. Farmer JD, Kauffman SA, Packard NH. Autocatalytic replication of polymers. *Physica*. 1986;220:50-67.
38. Wu M, Higgs PG. The origin of life is a spatially localized stochastic transition. *Biol Direct*. 2012;7(1):1. doi:10.1186/1745-6150-7-42
39. Kauffman SA. *The Origins of Order: Self-Organization and Selection in Evolution*. Oxford University Press; 1993.
40. Cohen JE. Threshold phenomena in random structures. *Discret Appl Math*. 1988;19(1-3):113-128. doi:10.1016/0166-218X(88)90008-X
41. Chen IA, Nowak MA. From Prolife to Life: How Chemical Kinetics Become Evolutionary Dynamics. *Acc Chem Res*. 2012;45(12). doi:10.1021/ar2002683
42. Mathis C, Bhattacharya T, Walker SI. The Emergence of Life as a First-Order Phase Transition. *Astrobiology*. 2017;17(3):266-276. doi:10.1089/ast.2016.1481
43. Vasas V, Fernando C, Santos M, Kauffman S, Szathmáry E. Evolution before genes. *Biol Direct*. 2012;7(1):1. doi:10.1186/1745-6150-7-1
44. Blokhuis A, Lacoste D, Nghe P. Universal motifs and the diversity of autocatalytic systems. *Proc Natl Acad Sci*. 2020. doi:10.1073/pnas.2013527117
45. King GAM. Symbiosis and the origin of life. *Orig Life*. 1977;8:39-53. doi:10.1201/9780203009918
46. Poole AM. Horizontal gene transfer and the earliest stages of the evolution of life. *Res Microbiol*. 2009;160(7):473-480. doi:10.1016/j.resmic.2009.07.009
47. Matsumura S, Kun Á, Ryckelynck M, et al. Transient compartmentalization of RNA replicators prevents extinction due to parasites. *Science*. 2016;354(6317):1293-1296.
48. Woese CR, Fox GE. The Concept of Cellular Evolution. *J Mol Evol*. 1977;10:1-6.
49. Woese CR. On the evolution of cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(13):87428747. doi:10.1073/pnas.132266999
50. Arnoldt H, Strogatz SH, Timme M. Toward the Darwinian transition: Switching between distributed and speciated states in a simple model of early life. *Phys Rev E*. 2015;92(5):1-9. doi:10.1103/PhysRevE.92.052909

51. Claverys J-P, Prudhomme M, Martin B. Induction of Competence Regulons as a General Response to Stress in Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60(1):451-475. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142139
52. Kovács ÁT, Smits WK, Mirończuk AM, Kuipers OP. Ubiquitous late competence genes in *Bacillus* species indicate the presence of functional DNA uptake machineries: Minireview. *Environ Microbiol.* 2009;11(8):1911-1922. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01937.x
53. Eigen M, Schuster P. The Hypercycle A Principle of Natural Self-Organization. *Die Naturwissenschaften.* 1977;64:541-565. doi:10.1007/978-3-642-67247-7_1
54. Eigen M, McCaskill J, Schuster P. Molecular quasi-species. *J Phys Chem.* 1988;92(24):6881-6891. doi:10.1021/j100335a010
55. Budin I, Szostak JW. Expanding Roles for Diverse Physical Phenomena During the Origin of Life. *Annu Rev Biophys.* 2010;39(1):245-263. doi:10.1146/annurev.biophys.050708.133753
56. Cheng LKL, Unrau PJ. Closing the circle: replicating RNA with RNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(10):a002204. doi:10.1101/cshperspect.a002204
57. Obermayer B, Frey E. Escalation of error catastrophe for enzymatic selfreplicators. *Europhys Lett.* 2009;88(4). doi:10.1209/0295-5075/88/48006
58. Ichihashi N, Yomo T. Constructive approaches for understanding the origin of selfreplication and evolution. *Life.* 2016;6(3):1-12. doi:10.3390/life6030026
59. Kun Á, Santos M, Szathmáry E. Real ribozymes suggest a relaxed error threshold. *Nat Genet.* 2005;37(9):1008-1011. doi:10.1038/ng1621
60. Takeuchi N, Poorthuis PH, Hogeweg P. Phenotypic error threshold; additivity and epistasis in RNA evolution. *BMC Evol Biol.* 2005;5:1-9. doi:10.1186/1471-2148-59
61. Szathmáry E, Demeter L. Group selection of early replicators and the origin of life. *J Theor Biol.* 1987;128(4):463-486. doi:10.1016/S0022-5193(87)80191-1
62. Grey D, Hutson V, Szathmáry E. A re-examination of the stochastic corrector model. *Proc R Soc B Biol Sci.* 1995;262(1363):29-35. doi:10.1098/rspb.1995.0172
63. Blokhuis A, Nghe P, Peliti L, Lacoste D. The generality of transient compartmentalization and its associated error thresholds. *J Theor Biol.* 2020;487:110110. doi:10.1016/j.jtbi.2019.110110
64. Szabó P, Scheuring I, Czárán T, Szathmáry E. In silico simulations reveal that replicators with limited dispersal evolve towards higher efficiency and fidelity. *Nature.* 2002;420(6913):340-343. doi:10.1038/nature01187
65. Shah V, de Bouter J, Pauli Q, Tupper AS, Higgs PG. Survival of RNA replicators is much easier in protocells than in surface-based, spatial systems. *Life.* 2019;9(3). doi:10.3390/life9030065
66. Horning DP, Joyce GF. Amplification of RNA by an RNA polymerase ribozyme. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(35):9786-9791. doi:10.1073/pnas.1610103113
67. Attwater J, Raguram A, Morgunov AS, Gianni E, Holliger P. Ribozyme-catalysed RNA synthesis using triplet building blocks. *Elife.* 2018;7:1-25. doi:10.7554/eLife.35255

68. Johnston WK, Unrau PJ, Lawrence MS, Glasner ME, Bartel DP. RNA-catalyzed RNA polymerization: Accurate and general RNA-templated primer extension. *Science*. 2001;292(5520):1319-1325. doi:10.1126/science.1060786
69. Schuster P, Fontana W, Stadler PF, Hofacker IL. From sequences to shapes and back: A case study in RNA secondary structures. *Proc R Soc B Biol Sci*. 1994;255(1344):279-284. doi:10.1098/rspb.1994.0040
70. Gumbel EJ. *Statistics of Extremes*. New-York: Columbia University Press; 1958.
71. Boyer S, Biswas D, Soshee AK, et al. Hierarchy and extremes in selections from pools of randomized proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(13):3482-3487. doi:10.1073/pnas.1517813113
72. Pressman A, Moretti JE, Campbell GW, Müller UF, Chen IA. Analysis of in vitro evolution reveals the underlying distribution of catalytic activity among random sequences. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(14):8167-8179. doi:10.1093/nar/gkx540
73. Mutschler H, Taylor AI, Porebski BT, et al. Random-sequence genetic oligomer pools display an innate potential for ligation and recombination. *Elife*. 2018;7:1-26. doi:10.7554/elife.43022
74. Blokhuis A, Lacoste D. Length and sequence relaxation of copolymers under recombination reactions. *J Chem Phys*. 2017;147(9):094905. doi:10.1063/1.5001021
75. Mizuuchi R, Blokhuis A, Vincent L, Nghe P, Lehman N, Baum D. Mineral surfaces select for longer RNA molecules. *Chem Commun*. 2019;55(14):2090-2093. doi:10.1039/c8cc10319d
76. Kawamura K, Maurel MC. Walking over 4 Gya: Chemical Evolution from Photochemistry to Mineral and Organic Chemistries Leading to an RNA World. *Orig Life Evol Biosph*. 2017;47(3):281-296. doi:10.1007/s11084-017-9537-2
77. Kitadai N, Maruyama S. Origins of building blocks of life: A review. *Geosci Front*. 2018;9(4):1117-1153. doi:10.1016/j.gsf.2017.07.007
78. Benner SA, Bell EA, Biondi E, et al. When Did Life Likely Emerge on Earth in an RNA-First Process? *ChemSystemsChem*. 2020;e1900035. doi:10.1002/syst.201900035
79. Campbell TD, Febrian R, Forsythe JG, Bracher PJ, Mccarthy JT, Kleinschmidt HE. Prebiotic condensation through wet-dry cycling regulated by deliquescence. *Nat Commun*. 2019;10:4508. doi:10.1038/s41467-019-11834-1
80. Patel BH, Percivalle C, Ritson DJ, Duffy CD, Sutherland JD. Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nat Chem*. 2015;7(4):301-307. doi:10.1038/nchem.2202
81. Jain S, Krishna S. Autocatalytic sets and the growth of complexity in an evolutionary model. *Phys Rev Lett*. 1998;81(25):5684-5687. doi:10.1103/PhysRevLett.81.5684
82. Luisi PL. Contingency and determinism. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci*. 2003;361(1807):1141-1147. doi:10.1098/rsta.2003.1189

83. Caporael LR, Griesemer JR, Wimsatt WC. Developing scaffolds: An introduction. In: *Developing Scaffolds in Evolution, Culture, and Cognition*. ; 2014:1-20.
84. Hordijk W, Naylor J, Krasnogor N, Fellermann H. Population Dynamics of Autocatalytic Sets in a Compartmentalized Spatial World. *Life*. 2018;8(3):33. doi:10.3390/life8030033
85. Joyce GF, Szostak JW. Protocells and RNA Self-Replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(9):a034801. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A034801
86. Martin W, Russell MJ. On the origins of cells: A hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2003;358(1429):5985. doi:10.1098/rstb.2002.1183
87. Damer B, Deamer D. The hot spring hypothesis for an origin of life. *Astrobiology*. 2020;20(4):429-452. doi:10.1089/ast.2019.2045
88. Camprubí E, de Leeuw JW, House CH, et al. The Emergence of Life. *Space Sci Rev*. 2019;215(8):1-53. doi:10.1007/s11214-019-0624-8
89. Becker S, Feldmann J, Wiedemann S, et al. Unified prebiotically plausible synthesis of pyrimidine and purine RNA ribonucleotides. *Science*. 2019;366(6461):76-82. doi:10.1126/science.aax2747
90. Briones C, Stich M, Manrubia SC. The dawn of the RNA World: Toward functional complexity through ligation of random RNA oligomers. *RNA*. 2009;15:743-749. doi:10.1261/rna.1488609.Orgel
91. Higgs PG, Lehman N. The RNA World: Molecular cooperation at the origins of life. *Nat Rev Genet*. 2015;16(1):7-17. doi:10.1038/nrg3841
92. Lancet D, Zidovetzki R, Markovitch O. Systems protobiology: Origin of life in lipid catalytic networks. *J R Soc Interface*. 2018;15(144). doi:10.1098/rsif.2018.0159
93. Cleaves HJ, Butch C, Burger PB, Goodwin J, Meringer M. One among Millions: The Chemical Space of Nucleic Acid-Like Molecules. *J Chem Inf Model*. 2019. doi:10.1021/acs.jcim.9b00632
94. Yu H, Zhang S, Chaput JC. Darwinian evolution of an alternative genetic system provides support for TNA as an RNA progenitor. *Nat Chem*. 2012;4(3):183-187. doi:10.1038/nchem.1241
95. Schank JC, Wimsatt WC. Generative Entrenchment and Evolution. *Proc Bienn Meet Philos Sci Assoc*. 1986;2:33-60.
96. Kauffman SA. Prolegomenon to patterns in evolution. *BioSystems*. 2014;123:3-8. doi:10.1016/j.biosystems.2014.03.004
97. Illangasekare M, Turk R, Peterson GC, Lladser M, Yarus M. Chiral histidine selection by D-ribose RNA. *Rna*. 2010;16(12):2370-2383. doi:10.1261/rna.2385310
98. Sutherland JD. Studies on the origin of life-The end of the beginning. *Nat Rev Chem*. 2017;1:1-8. doi:10.1038/s41570-016-0012
99. Malaterre C, Chartier J-F. Beyond categorical definitions of life: a data-driven approach to assessing liveness. *Synthese*. 2019;198:4543-4572. doi:10.1007/s11229-019-02356-w

100. Bruylants G, Bartik K, Reisse J. Prebiotic chemistry: A fuzzy field. *Comptes Rendus Chim.* 2010;14(4):388-391. doi:10.1016/j.crci.2010.04.002
101. Szathmáry E. In search of the simplest cell. *Nature.* 2005;433(February):469-470.
102. Bedau MA. A functional account of degrees of minimal chemical life. *Synthese.* 2012;185(1):73-88. doi:10.1007/s11229-011-9876-x
103. Benner SA. Prebiotic plausibility and networks of paradox-resolving independent models. *Nat Commun.* 2018;9(1):9-11. doi:10.1038/s41467-018-07274-y
104. Orgel LE. The implausibility of metabolic cycles on the prebiotic earth. *PLoS Biol.* 2008;6(1):0005-0013. doi:10.1371/journal.pbio.0060018
105. Schwartz AW. Evaluating the plausibility of prebiotic multistage syntheses. *Astrobiology.* 2013;13(8):784-789. doi:10.1089/ast.2013.1057
106. Stüeken EE, Anderson RE, Bowman JS, et al. Did life originate from a global chemical reactor? *Geobiology.* 2013;11(2):101-126. doi:10.1111/gbi.12025
107. Sasselov DD, Grotzinger JP, Sutherland JD. The origin of life as a planetary phenomenon. *Sci Adv.* 2020;6(6):1-10. doi:10.1126/sciadv.aax3419

9. Conclusion

Cette thèse est un exemple de pluralisme épistémique. Elle affirme comment différentes méthodologies propres aux sciences de la nature et aux sciences humaines et sociales peuvent être combinées pour participer à une compréhension globale d'un faisceau de phénomènes relatif l'origine de la vie et à l'ambition de la synthétiser en laboratoire.

Le chapitre 2 a offert un cadre théorique large pour situer les travaux retranscrits dans les chapitres suivants. Nous avons ainsi montré que la question de l'origine de la vie s'interprète de multiples façons dans la recherche scientifique actuelle. Pour la clarifier, nous dégageons trois axes de contraintes qui décomposent la question : l'adéquation historique, la spontanéité naturelle et la similarité avec la vie telle que nous la connaissons. Dans leur acception rigoureuse,

la première contrainte exige de prendre en compte les conditions de la Terre primitive, la seconde proscrit toute intervention humaine dans le processus d'émergence de la vie, et la troisième impose une étape finale identique à la vie telle que nous la connaissons. Dès lors les différentes combinaisons de ces contraintes aboutissent à 8 grands types de questions allant de la question la plus contrainte « comment la vie telle que nous la connaissons est spontanément apparue sur Terre ? » à la moins contrainte « comment est-il possible de faire émerger n'importe quelle forme de vie ? ». Mais ces différentes questions n'ont pas le même statut épistémologique. C'est-à-dire que l'explanandum (i.e. ce qui est à expliquer) est très probablement vrai pour la question la plus contrainte mais spéculatif pour celle des moins contraintes. En effet, tout laisse à croire qu'il y a bien eu une origine de la vie sur Terre alors que personne n'a jamais convaincu la communauté scientifique d'avoir réellement fabriqué la vie en laboratoire. De ce fait la nature de la question dépend du degré de contraintes qui lui est appliqué. Alors que la version la plus contrainte est une question de recherche d'explication (*explanation-seeking questions*), les versions les moins contraintes sont avant tout des questions d'établissements de faits (*fact-establishing question*). Il faudrait donc en toute logique d'abord prouver qu'il est faisable de « créer » la vie en laboratoire avant de pouvoir expliquer ce phénomène. Une fois cette étape franchie, la question passerait alors d'une question d'établissement de faits à une question de recherche d'explication, et il est par ailleurs envisageable que les deux questions puissent trouver une réponse au même moment.

Nous avons également montré que les choix des questions abordées par les chercheurs dépendent fortement de considérations sur la facilité de traitement (*tractability*) qui augmente à mesure que certaines contraintes sont relâchées. Il paraît plus facile par exemple de chercher à mettre en route une dynamique d'évolution darwinienne via la technologie de la microfluidique en gouttelettes plutôt que d'attendre qu'elle advienne d'elle-même dans une petite marre chaude dans des conditions prébiotiques. Cependant ce type d'évolution n'a jamais formellement émergé dans des systèmes microfluidiques sophistiqués mais a très probablement émergé il y a quelques milliards d'années sur Terre dans des conditions prébiotiques. Par ailleurs, s'attaquer à des questions d'origine de la vie moins contraintes, donc de l'ordre de l'établissement de faits, facilite les réponses à des questions plus contraintes. Il est par exemple utile de savoir qu'il est possible de faire émerger telle ou telle dynamique de biomolécules dans des conditions contrôlées de laboratoire pour pouvoir par la suite chercher à reproduire cette transition dans des conditions prébiotiques.

Dans le chapitre 3 nous avons décrit et analysé de façon ethnographique la façon dont certains chercheurs du laboratoire de biochimie abordent la question de l'origine de la vie par la synthèse et la mise en œuvre de dynamiques d'évolution darwinienne. Nous avons montré la conception, la fabrication, l'interprétation et la restitution d'artefacts supposés s'inscrire dans une évolution de l'inerte au vivant que nous avons appelé « protovies ».

Le laboratoire de biochimie (LBC) est un lieu organisé, les différentes pièces ont leurs propres spécificités, ce qui aboutit à deux observations. La subdivision du laboratoire en différentes pièces fonctionnelles coïncide avec la subdivision des protovies en différentes propriétés vitales.

Pour prendre l'exemple des protocellules microfluidiques (voir chapitre 4), les compartiments (gouttelettes) sont générés et restent dans la salle microfluidique alors que le protométabolisme (réaction de formose) est étudié séparément des compartiments dans le « big lab », même si ces deux propriétés sont combinées par la suite pour constituer des dynamiques émergentes. La seconde observation est que cette subdivision du laboratoire en différentes pièces fonctionnelles coïncide aussi avec les différentes étapes de la mise au point des faits scientifiques, qui sont ici les démonstrations de fabrication de protovies. Ainsi, en prenant l'exemple de réseaux d'ARN (voir chapitre 5.2), la fabrication, la visualisation, l'analyse, la négociation et la restitution se font respectivement préférentiellement dans le big lab, le small lab, le bureau, la cuisine et le couloir. L'analyse du laboratoire en tant que lieu nous informe donc déjà sur les façons dont la vie se conçoit et les faits scientifiques émergent.

Plus qu'un lieu, le laboratoire de biochimie est aussi une équipe organisée qui interagit avec une diversité d'objets non-humains. Les différents membres de l'équipe aux rôles, compétences, activités et objectifs variés constituent un groupe uni derrière la technologie de la microfluidique en gouttelettes dont l'une des utilisations est la production et l'analyse de protovies. Cette dernière ne constitue qu'une voie parmi d'autres que les chercheurs empruntent pour fabriquer, modifier ou analyser des assemblages hybrides de biomolécules et de matériaux inertes ou des cellules biologiques.

En suivant le parcours de recherche d'Andrew, fondateur et chef d'équipe du laboratoire de biochimie, nous avons vu comment s'est effectué le glissement d'interprétations d'assemblages hybrides en des modélisations de propriétés vitales, puis en des réalisations de propriétés vitales, conférant alors aux artefacts le statut de protovie. Ce statut émerge d'un flou ontologique entre modélisation d'une forme de vie et réalisation d'une forme de vie qui persiste encore par instants.

L'analyse ethnographique a aussi révélé deux grands niveaux de conception de la vie soutenus par les chercheurs que nous avons appelé « spontané » et « discursif ». Les conceptions spontanées de la vie se manifestent lorsque les locuteurs donnent rhétoriquement des attributs vitaux à des objets qu'ils ne considèrent pourtant pas comme vivants lorsqu'on le leur demande, c'est-à-dire lorsqu'ils expriment leur conception discursive de la vie. Cette dernière, pour les chercheurs impliqués dans les projets d'origine de la vie, offre une place centrale à l'évolution darwinienne. Mais ils ont une approche pragmatique et parlent volontiers de définitions de travail pour guider leur fabrication de protovies. Ils s'accordent tous par ailleurs sur l'existence d'une zone grise franchissable entre l'inerte et le vivant, et sur une démarche : l'extension du regard biologique, c'est-à-dire l'interprétation de processus techniques physico-chimiques en processus vitaux. Ce positionnement face au vivant et à sa fabrication relève d'une culture épistémique spécifique que d'autres scientifiques du laboratoire ne partagent pas et à laquelle sont confrontés les nouveaux arrivants sur les projets de protovies. Certains renoncent à s'impliquer dans de tels projets du fait d'une différence culturelle trop forte, d'autres passent par une période d'enculturation plus ou moins longue.

Le tour d'horizon des principales protovies fabriquées au laboratoire (dont celles retranscrites dans les chapitres 4.2 et 5.2) montre pour chacune d'elles quels processus physico-chimiques sont interprétés comme l'acquisition de nouvelles propriétés vitales. Malgré la diversité des techniques de synthèse et de visualisation et la diversité des matériaux utilisées, la conception

darwinienne de la vie des chercheurs se retrouve dans l'ensemble de ces protovies. De plus, du fait de l'implication des expérimentateurs et de la diversité des matériaux utilisés, ces pratiques de recherche offrent des réponses aux questions les moins contraignantes sur l'origine de la vie (voir chapitre 2).

Une description fine des étapes de fabrication, d'analyse et d'interprétation des protovies sous la forme d'une chaîne opératoire met en valeur la variation des degrés de vie des objets utilisés et produits à chaque étape, tout en étant attentif à d'autres modes de fabrication sur la forme de ce que nous avons appelé « tâtonnement » et « bricolage ». Enfin, à partir de l'étude d'un projet particulier, nous avons décrit et analysé comment des phénomènes inattendus sont interprétés comme des réalisations de protovies après discussions et négociations.

Fort des observations de ce chapitre et à la lumière d'autres travaux scientifiques et anthropologiques, le concept de protovie se dessine plus nettement. Une protovie désigne un objet artéfactuel entre l'inerte et le vivant, et évoluant vers des degrés de vie supérieurs par acquisition de propriétés vitales. Elle possède une composante biomimétique, elle incarne les conceptions de la vie de ses créateurs, et aboutie à la constitution de récits qui sont la forme finale recherchée. Étudier les protovies aide à mieux comprendre la transition de l'inerte au vivant autant que les conceptions de la vie de leurs créateurs.

Le chapitre 4 tire sa force de la mise en parallèle des restitutions ethnographiques et scientifiques des mêmes activités de recherche. Le projet ici doublement retranscrit démontre expérimentalement la croissance et la reproduction de protocellules par le biais de réactions autocatalytiques conduisant à une aptitude émergente au niveau du compartiment.

La première grande étape consiste à placer des gouttelettes en rangées pour étudier leur croissance et décroissance induites par osmose du fait de réactions autocatalytiques inégalement réparties entre deux types de populations de gouttes. Dans la partie ethnographique, nous avons caractérisé cette étape comme une « imitation d'êtres vivants » (plus précisément de cellules) consistant à la production et l'analyse de compartiments semi-perméables d'eau liquide comportant une chimie autocatalytique.

La seconde grande étape consiste à placer les deux populations de gouttes dans une puce à deux dimensions, d'induire une disparité de croissance et de décroissance puis d'appliquer une division sélective de certaines gouttes par cisaillement hydrodynamique. L'étude des taux de croissance des gouttes avant et après division établit une corrélation qui indique une hérédité non génétique. Dans la partie ethnographique, cette étape est caractérisée comme une « modélisation de la vie ».

Ces deux caractérisations d'imitation d'êtres vivants et de modélisation de la vie soulignent la différence de portée de ces étapes. Il est possible en effet de distinguer le vivant de la vie, et une des caractéristiques discriminantes les plus évoquées est la reproduction. Pour beaucoup, et pour Tibor Gánti dont l'influence théorique plane sur ce projet, un objet matériel peut être vivant même s'il ne peut pas se reproduire, mais la vie en temps qu'ensemble de processus a besoin de la reproduction, voire même de l'évolution pour exister. L'analyse ethnographique a aussi pu témoigner de la prise de conscience de l'élévation du degré de vie des gouttelettes entre

ces deux étapes au fur et à mesure des succès des expériences par des évolutions de vocabulaires et de considérations venant des chercheurs.

Les résultats des deux parties de ce chapitre illustrent le contraste entre contexte de découverte et contexte de justification. Entre la science en train de se faire, et la science qui se raconte, les concepts s'adaptent, disparaissent ou émergent. Ainsi l'article retranscrit en 4.2 ne mentionne plus « d'hérédité », de « cycles protocellulaires » ou de « gouttes mortes » mais « d'héritabilité non génétique » et de « cycles limites », et le processus de mort, pourtant érigé en propriété potentiel de la vie par Gánti, disparaît totalement de la restitution. Par ailleurs d'autres concepts apparaissent nettement comme ceux propres aux dynamiques écologiques. De plus dans la restitution il n'est plus mention de gouttelettes « efficaces » contre « non-efficaces », « gagnantes » contre « perdantes », « chanceuses » contre « malchanceuses » mais de « gouttelettes 0.2 M C2 » (0.2 M C2 droplets) et de « gouttelettes non C2 » (no C2 droplets) ne faisant alors référence plus qu'à leur différence de composition chimique. L'objectif de ces changements lors de la restitution finale est d'apporter les bons termes et les bons concepts pour convaincre au mieux les pairs d'avoir produit quelque chose proche du vivant tout en se protégeant d'éventuelles attaques sur la validité des interprétations et des concepts appliqués.

Enfin, dans le cadre du paysage conceptuel des questions sur l'origine de la vie (chapitre 2), ce projet cherche spécifiquement à répondre à une question de type ahistorique, agentielle et dissemblable. C'est-à-dire que l'objectif est de comprendre comment il est possible de fabriquer des entités qui se rapprochent d'une forme de vie dissemblable de celle que nous connaissons, avec les moyens technologiques actuels. La réaction de formose produit certes des glucides comme ceux que l'on retrouve dans la cellule, mais elle est utilisée ici pour ces propriétés de réaction autocatalytique et non pour la proximité de ces produits avec des biomolécules. Cependant, comme expliqué au chapitre 2, cette approche permet également de mieux comprendre la question historique de l'origine de la vie telle que nous la connaissons.

Dans le chapitre 5, nous avons fait en 5.1 un tour d'horizon des principales stratégies mises en place pour faire émerger une dynamique d'évolution darwinienne au sein de réseaux de réactions chimiques, et nous avons présenté en 5.2 les résultats expérimentaux d'un système d'ARN présentant les propriétés d'autoreproduction et de diversification, nécessaires à une évolution darwinienne. Cette dernière partie est à mettre en regard avec le chapitre 3 qui rend compte des cheminements expérimentaux, conceptuels et sociaux qui sont à l'origine des résultats présentés.

Nous avons d'abord montré dans la partie 5.1 la possibilité de traduire le concept biologique d'hérédité dans des systèmes de réactions chimiques. Ensuite nous avons examiné différentes stratégies pour mettre en œuvre des propriétés darwiniennes : principalement la réplication, l'auto-reproduction, la variation et dans une moindre mesure la sélection. La réalisation expérimentale de systèmes autocatalytiques qui utilisent la ligature ou la réplication basée sur des polymères modèles (*template-based ligation*), appliquée à l'ADN, l'ARN et aux peptides constitue un type de stratégie. Les ensembles autocatalytiques en constituent un autre et nous

avons présenté leur théorie, leur mise en œuvre expérimentale et les voies possibles de leur évolution. Le développement d'ARNs de type Group I Intron modifiés est une stratégie particulièrement modulable pour permettre à la fois la réplication sur polymère modèle (*template-based replication*) et la réplication en l'absence de polymère modèle (non *templatebased replication*) dans des systèmes à ARN. Enfin, des approches récentes pour découvrir des réseaux de réactions évolutifs émergents spontanément dans des mélanges complexes hors équilibre, sans connaissance réductionniste, offrent une nouvelle source de résultats. Ces types d'expériences illustrent la possibilité de répondre à des questions d'établissement de fait (*factestablishing questions*) avant de répondre à des questions de recherche d'explication (*explanation-seeking questions*), tel que décrit dans le chapitre 2. Grâce à l'ensemble des exemples détaillés, nous avons montré que l'évolution est un phénomène bien plus large que la stricte évolution darwinienne de lignées de compartiments couplée à une réplication. Ainsi l'évolution aurait pu apparaître sur la base d'une autoreproduction collective avant la réplication basée sur polymères modèles lors de l'origine de la vie. Pour finir, nous avons proposé trois axes de recherche pour établir des scénarios d'émergence d'évolution fondés sur la réplication collective avant l'avènement de la réplication sur polymère modèle. Premièrement, élargir la gamme des systèmes autocatalytiques disponibles expérimentalement. Deuxièmement, déterminer les conditions de viabilité des systèmes autocatalytiques. Et troisièmement, mettre en œuvres une combinaison de propriétés évolutives admettant au moins deux états héréditaires.

La partie 5.2 atteste la diversification de séquences d'ARN induite par un ribozyme de type Group I Intron (Azoarcus) capable d'autoreproduction. Un système composé de seulement 3 espèces d'ARN réagit sans apport d'énergie pour aboutir à de l'élongation et de la circularisation couplés à une autoreproduction, le tout intégré dans réseaux de réaction dont nous avons identifié les mécanismes. Nous avons en outre montré que la dynamique de ces réseaux peut être modélisée quantitativement et qu'un tel modèle prédit la diversité et la concentration des produits à partir de la connaissance des séquences initiales. La capacité du ribozyme Azoarcus à catalyser sa propre formation à partir de fragments plus petits, à se diversifier et à allonger d'autres fragments de façon neutre en énergie est un avantage notable dans le contexte de l'origine de la vie. En outre, les mécanismes d'élongation et de formation de la structure de l'ARN sont cruciaux pour générer des ARN fonctionnels, et la circularisation de l'ARN pourrait avoir été un moyen de stocker l'information génétique primordiale, favorisant ainsi l'hérédité. Cette étude ouvre globalement la voie à l'ingénierie de systèmes d'ARN évolutifs en combinant des mécanismes permettant la reproduction, la diversification et la formation de nouveaux ARN structurés.

Ces résultats sont l'aboutissement de nombreuses opérations techniques et discussions conceptuelles décrites au chapitre 3, qui a montré la centralité de l'évolution darwinienne dans la conception de la vie rencontrée au LBC. Les matériaux utilisés n'ont rien à voir avec les expériences microfluidiques décrites dans le chapitre précédent, ce qui confirme un autre aspect : la matérialité chimique s'efface derrière le processus. Le choix de l'ARN pourrait pourtant plaider en faveur d'une volonté d'utiliser des biomolécules, propres à la vie telle que nous la connaissons, pour la faire émerger à nouveau. Or, ce n'est pas le cas. L'ARN est surtout utilisé ici pour ses propriétés chimiques propices à des dynamiques évolutives, et si une

nouvelle molécule plus efficace serait découverte, elle ne manquerait pas de remplacer l'ARN. Enfin, pour situer cette recherche dans le paysage conceptuel dessiné au chapitre 2, nous pouvons dire que la question de l'origine de la vie qui est abordée ici est formellement de type ahistorique, agentielle et dissemblable. Elle diffère cependant, en termes de degré de relâchement des contraintes, de celle abordée dans la partie 4.2. En effet, l'utilisation de l'ARN peut être rapprochée d'un questionnement historique, du fait de l'hypothèse du monde ARN, malgré des conditions expérimentales peu plausibles historiquement, comme l'utilisation de solutions d'eau à 60 mM de $MgCl_2$. De plus les réseaux d'ARN nécessitent moins d'intervention humaine que la microfluidique en gouttelettes et pourraient constituer des systèmes intermédiaires qui pourraient faire partie d'une évolution vers la vie telle que nous la connaissons.

Nous avons enfin exposé dans le chapitre 6 une stratégie pour faciliter la recherche interdisciplinaire sur l'origine de la vie. Elle suggère l'identification et la paramétrisation de seuils, et le test théorique et empirique de transitions de seuils pour construire des scénarios d'origine de la vie autour d'étapes clefs. Les seuils séparent deux états qualitativement distincts d'un système, dont le passage de l'un à l'autre peut être rendu possible par la variation de quelques paramètres physico-chimiques. De nombreuses transitions de seuils existent dans la littérature scientifique sur l'origine de la vie mais restent encore très peu explicités. Nous avons par exemple montré que des études expérimentales et théoriques indiquent respectivement l'apparition soudaine de vésicules, une fois une concentration en CO_2 atmosphérique limite dépassée, et l'enclenchement d'une dynamique de réplifications, une fois un niveau de diversité de polymères atteint qui pourrait d'ailleurs découler de mécanismes de diversification décrits au chapitre 5.2. Dans le chapitre 4.2 nous avons de plus mis en évidence un seuil de volume délimitant dans un espace de paramètres un régime de division protocellulaire. En prenant le seuil d'erreur de la réplification (*error threshold*) comme cas d'étude, nous établissons comment la recherche sur ce seuil a rassemblé de nombreuses disciplines scientifiques sur une question précise et bien définie, accessible qualitativement et quantitativement. Les modélisations et expériences réalisées ont conduit à modifier l'équation de ce seuil aboutissant à augmenter ou diminuer la plausibilité d'un régime de réplification par auto-replicase dans certaines conditions. Certaines considérations aboutissent même à l'impossibilité d'un tel régime conduisant nécessairement la recherche de nouvelles voies de transitions. Enfin, sous la forme de diagramme de phase, nous avons montré comment formaliser les transitions de seuils et comment les articuler en séries pour construire des scénarios d'origine de la vie testables et modulables pouvant guider la coordination interdisciplinaire d'expériences, d'observations et de théorie.

Les travaux retranscrits dans cette thèse questionnent tous par différentes méthodes l'origine de la vie. Cet événement historique constituera en tout état de cause une éternelle interrogation

pour l'humain qui n'a pas accès à ce qu'il s'est passé il y a quelques milliards d'années. Mais pour satisfaire son besoin de réponses, il peut se saisir d'une autre option : réinventer l'origine de la vie par sa fabrication en laboratoire. Pour l'instant personne n'a convaincu la communauté scientifique d'avoir ainsi synthétisé la vie, mais une chose est certaine : nous assistons déjà à la fabrication de multiples protovies qui matérialisent de possibles états de transitions entre l'inerte et le vivant. Cette ambition de fabrication de la vie en laboratoire pourrait donner des airs de démiurges ou d'apprentis sorciers aux chercheurs qui s'y consacrent, mais la réalité de la fabrication de protovies désamorce ces malentendus. Aucune frontière nette ne semble séparer le vivant de l'inerte qui ne constituent que différents états de la matière unis par une zone grise, bien que certains seuils existent. Ce constat ouvre alors la voie à une exploration d'un monde « infravivant » peuplé d'objets naturels et synthétiques qui questionnent ce que l'on considère comme vivant. Enfin, la compréhension de cette zone de flou ontologique entre le non-vivant et le vivant ne pourra pas se faire sans une association entre la connaissance des propriétés évolutives de la matière et la compréhension des cadres interprétatifs humains qui leur confèrent leur signification. Nous espérons que cette thèse en aura montré les bénéfices.