



HAL
open science

Etude d'un système de transition basé sur des acides gras dans les processus d'encapsulation de biomolécules : vers un nouveau modèle de cellule minimale

David Garenne

► To cite this version:

David Garenne. Etude d'un système de transition basé sur des acides gras dans les processus d'encapsulation de biomolécules : vers un nouveau modèle de cellule minimale. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0365 . tel-01662356

HAL Id: tel-01662356

<https://theses.hal.science/tel-01662356>

Submitted on 13 Dec 2017

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

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



Thèse pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Bordeaux

Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé
Spécialité : Biochimie

Soutenue Le 12 Décembre 2016

Par **David GARENNE**

Né le 10 Décembre 1989 à La Rochelle (Charente-Maritime)

**Etude d'un système de transition basé sur des acides gras dans les
processus d'encapsulation de biomolécules**

Vers un nouveau modèle de cellule minimale

Membres du jury

Mr BARTHELEMY Philippe, Professeur universitaire

Mr BOUHALLAB Saïd, Directeur de Recherche

Mr RENARD Denis, Directeur de Recherche

Mr BARET Jean-Christophe, Professeur universitaire

Mr GAILLARD Cédric, Ingénieur de Recherche

Mr DOULIEZ Jean-Paul, Directeur de Recherche

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de l'unité mixte de recherche 1332 Biologie et pathologie du fruit (Institut national de la recherche agronomique et université de bordeaux) dans l'équipe Mollicutes dirigée par Mr Alain Blanchard, sous la direction de Mr Jean-Paul Douliez.

Je tiens tout d'abord à remercier Mr Alain Blanchard pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son laboratoire.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Mr S. Bouhallab ainsi qu'à Mr D. Renard d'avoir accepté d'examiner et de juger ce manuscrit.

Je remercie également Mr JC. Baret, Mr P. Barthélémy ainsi que Mr C. Gaillard d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

J'adresse un grand merci à Jean-Paul pour m'avoir accompagné pendant ces trois années de thèses. Merci pour ton encadrement de chaque instant. Je suis très fier d'avoir été ton padawan pendant ces trois années. Merci de m'avoir apporté ta vision de la science. Si j'en suis la maintenant, c'est grâce à toi.

Je tiens à remercier aussi Laure. Entre biochimistes, il a fallu qu'on se soutienne. Tu m'as appris à développer mon raisonnement scientifique. Tu m'as aussi appris ce qu'était la « maniaquerie » expérimentale, l'importance des 4.5 cm sur les plaques. Je retiendrais aussi ton amour indéfectible pour l'enseignement (oui oui) et pour le spiroplasma. Un grand merci à toi.

Je voudrais aussi adresser un remerciement particulier à Stephen Mann pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à Bristol, j'espère que notre collaboration va durer le plus longtemps possible. Merci à Nicolas avec qui j'ai pu travailler mais aussi passer du bon temps. Tu m'as fait découvrir la vie à Bristol, je t'en suis très reconnaissant, tu seras toujours le bienvenu à Bordeaux. Merci aussi à Dora, pour toutes ces discussions, tes idées formidables. J'espère que tout ce passe bien pour toi en Allemagne.

Je remercie également Frédérique Nallet pour avoir débuté mon initiation aux arts de la diffusion de Neutrons, merci d'avoir participé à ce travail. Merci aussi à Laurence et Erick pour leur précieux conseils.

Je remercie également les potes du labo. Rémi, tu as égayé ma première année de thèse, je sais que mes remerciements ne seront pas à la hauteur des tiens, mais tu es toi aussi un véritable ami. Merci aussi à Justine, tu es vraiment une fille super, je me suis tellement marré avec toi. Merci à Benoit et Anthony, merci pour toutes ces soirées, ces discussions

improbables, parfois scientifiques. Je ne serais jamais arrivé là sans vous, ne changez rien surtout.

Merci à mes compagnons thésard, Camille, Iason, et Estelle, bonne continuation et bon courage pour la fin de vos thèses, vous allez déchirer j'en suis sûr. Merci aussi à mes potes non-thésard, Vincent, Yonathan, Yanina, Fabien, Flavie, Michela. Merci pour tous ces moments passés ensemble.

J'adresse un remerciement collectif à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au laboratoire :

A Marie-Pierre, Christophe, Sandrine, Sybille, Fred, Nathalie, Joël, Colette, Xavier, Sylvie, Delphine, Pascal S, Thierry, Bernard, Jean-Luc, Pascal SP, Carole, Géraldine, Luis, Martine, Jacqueline, Anne, Angélique, Isabelle, Annie, Evelyne, Laurence, Brigitte.

Merci aussi à Valie, Bernadette, Amandine, Amandine, Laure, Sébastien, David, toujours présents lors de mes nombreuses apparitions en Virologie. Au final, je fais un peu partie de votre équipe.

Je tiens aussi à remercier mes parents qui ont toujours été présents pour moi, dans toutes les situations. Merci pour votre confiance de chaque instant, merci pour l'intérêt que vous avez toujours porté à ma recherche, aussi obscure soit-elle. Je vous en suis éternellement reconnaissant.

Je remercie également mes frères et ma sœur. Simon, tu restes un expert de l'apoptose, un peu moins du citron, il faut que tu bosses un peu là-dessus. Je te suis très reconnaissant pour tous ces moments passés avec toi, et pour tous les autres à venir. Merci d'avoir toujours été là et de m'avoir supporté ces longues années. Régis et Sylvie, merci pour tous ces moments passés ensemble, je n'aurais jamais pu en être là aujourd'hui sans vous.

Un grand merci aussi à tous mes amis sur La Rochelle, Bordeaux, Paris... j'espère fêter cela dignement avec vous.

Une dernière pensée toute particulière pour Céline qui a dû me supporter pendant mes trois années de thèse, qui a connu les moments les plus durs comme les plus heureux. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, j'espère que tu auras à me supporter encore longtemps.

Liste des publications et des communications à des congrès

Garenne, D., Navailles, L., Nallet, F., Grélard, A., Dufourc, E.J. & Douliez, JP.
Clouding in fatty acid dispersions for charge-dependent dye extraction
Journal of Colloid and Interface Science 2016, 468 95-102

Garenne, D., Béven, L., Navailles, L., Nallet, F., Dufourc, E.J. & Douliez, JP.
Sequestration of Proteins by Fatty Acid Coacervates for Their
Encapsulation within Vesicles *Angewandte Chemie* 2016, 17;55(43):13475-13479

Garenne, D., Navailles, L., Nallet, F., Grélard, A., Dufourc, E.J. & Douliez, JP
Etude du phénomène de coacervation chez les acides comme nouveau modèle
d'encapsulation de molécules.
6^{ème} Journées des doctorants SPE.3-5/06/2014. Bordeaux. COMMUNICATION
ORALE

Garenne, D., Navailles, L., Nallet, F., Grélard, A., Dufourc, E.J. & Douliez, JP
Etude des systèmes de transition d'acides gras à longues chaînes en vue
d'encapsuler des biomolécules.
15^{ème} Journée scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la vie et de la santé.
16/04/2015. Arcachon. POSTER

Garenne, D., Navailles, L., Nallet, F., Grélard, A., Dufourc, E.J. & Douliez, JP.
Molecular crowding in fatty acid coacervates allows for their encapsulation
within vesicles.
29^{ème} conférence du « European Colloid et Interface Society » (ECIS). 6-
11/09/2016. Bordeaux. POSTER

Garenne, D., Béven, L., Navailles, L., Nallet, F., Dufourc, E.J. & Douliez, JP.
Sequestration of Proteins by Fatty Acid Coacervates for Their
Encapsulation within Vesicles.
16^{ème} Journée scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la vie et de la santé.
16/04/2016. Arcachon. POSTER récompensé par le Prix du meilleur poster

Garenne, D., Béven, L., Navailles, L., Nallet, F., Dufourc, E.J. & Douliez, JP.

Sequestration of Proteins by Fatty Acid Coacervates for Their
Encapsulation within Vesicles.

2^{ème} colloque du GDR Biologie de Synthèse. 27-29/06/2016. Bordeaux. POSTER

Garenne, D., Béven, L., Navailles, L., Nallet, F., Dufourc, E.J. & Douliez, JP.

Sequestration of Proteins by Fatty Acid Coacervates for Their
Encapsulation within Vesicles.

Workshop "Protocells: artificial cells, minimal cells, from structure to function.

5/10/2016 POSTER

Table des matières

INTRODUCTION	19
1) La cellule minimale	21
A/ Approche top down	22
B/ Approche bottom up	23
2) Les compartiments	26
A/ Les compartiments vésiculaires	26
a) Vésicules lipidiques	26
i. Méthodes de préparation	28
ii. Division du compartiment	38
b) Vésicules d'acides gras	41
i. Méthode de formation	41
ii. Encapsulation de biomolécules	43
iii. Division du compartiment	44
B/ Les compartiments non-vésiculaires	46
a) Les colloïdosomes	46
b) Les protéinosomes	48
c) Les polymèresomes	48
C/ Les coacervats	50
a) Méthode de formation	50
b) Encapsulation de biomolécules	52
c) Les systèmes hybrides	53
3) Les bactéries de la classe des mollicutes comme cellules minimales du vivant.	54
A/ Présentation	54
B/ Transplantation de génomes	55
4) Extraction de protéines de bactéries dans des compartiments	57
 OBJECTIF DES TRAVAUX	 59
 CARACTERISATION DU SYSTEME DE TROUBLE CHEZ LES ACIDES GRAS	 67
1) Publication	67
2) Résumé de la publication	68
3) Conclusion	70
 ETUDE DE L'ENCAPSULATION DE BIOMOLECULES DANS DES VESICULES D'ACIDES GRAS A TRAVERS LA SEQUESTRATION DANS LES COACERVATS	 73
1) Publication	73
2) Résumé de la publication	74
3) Résultats complémentaires	77
A/ Séquestration de biomolécules dans les coacervats	77

B/	Influence du pH sur la séquestration des protéines dans les coacervats	79
C/	Effet détergent des acides gras sur la dénaturation des enzymes dans les coacervats	80
a)	Mesure de l'activité de la glucose oxydase	80
b)	Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase	81
D/	Paramètres cinétiques de la glucose oxydase dans les vésicules	82
E/	Influence de la taille des vésicules sur les taux d'encapsulation de protéines	84
F/	Expression de protéines dans les vésicules	86
4)	Conclusion	88

EXTRACTION DES PROTEINES DE MOLLICUTES DANS LES VESICULES D'ACIDES GRAS **91**

1)	Introduction et objectifs	91
2)	Résultats	91
A/	Extraction des protéines dans les coacervats	91
B/	Quantification de l'encapsulation dans les vésicules	93
C/	Activité enzymatique et localisation de la lactate déshydrogénase	94
a)	Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase dans un tampon	95
b)	Localisation de la lactate déshydrogénase dans les vésicules par fluorescence	96
c)	Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase dans les vésicules	97
D/	Activité glycolytique dans les vésicules	98
3)	Conclusion	100

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES **101**

MATERIELS ET METHODES **111**

1)	Préparation des échantillons d'acides gras	111
2)	Méthodes de caractérisation	112
A/	RMN du solide	112
B/	Diffusion de neutrons (SANS)	112
C/	Microscopie	113
a)	Microscope à fond noir	114
b)	Microscope à épifluorescence	114
c)	Microscopie confocale	115
D/	Marquages fluorescents	115
E/	Séquestration des sondes moléculaires	116
3)	Matériel biologique	117
A/	Spiroplasma citri : souches et conditions de culture	117
a)	Extraction de protéines de S. citri dans les coacervats	118
B/	Escherichia coli : souches et utilisation	119
a)	Synthèse de YFP recombinante	119
i.	Plasmides	119
ii.	Transformation	120

iii.	Production de protéines recombinantes	120
iv.	Purification des protéines recombinantes	121
c)	Système cell-free	123
4)	Méthodes d'analyse	123
A/	Quantification des protéines	123
a)	Spectrométrie UV-Visible	123
b)	Séparation des protéines en gel d'électrophorèse	124
i.	Gels de polyacrylamide	124
c)	Visualisation des protéines après électrophorèse	126
i.	-Coloration au bleu colloïdal	126
ii.	-Coloration au Kang Coomassie	127
iii.	Coloration au nitrate d'argent	127
d)	Quantification des bandes protéiques	128
B/	Quantification des protéines encapsulées	128
5)	Réactions enzymatiques	129
A/	La glucose oxydase	129
B/	La Phosphatase alcaline	130
C/	La horse radish peroxydase	130
D/	Lactate déshydrogénase	131
a)	Protéine commerciale	131
b)	Protéine de Spiroplasma citri	131
i.	Mesure de fluorescence	131
ii.	Mesure de l'absorbance à 340 nm	131
E/	Mesure de l'activité glycolytique	132
a)	Mesure de l'absorbance à 340 nm	132
b)	Mesure de la fluorescence	133
	BIBLIOGRAPHIE	135

Introduction

Introduction

La vie est apparue sur Terre il y a 3.8 milliards d'années. De manière hypothétique, les conditions prébiotiques à partir desquelles la vie a potentiellement pu apparaître semblaient favorables à la formation de molécules simples considérées aujourd'hui comme les briques élémentaires du vivant (Lazcano et Bada, 2003). Il a été postulé que l'ARN aurait existé largement avant l'ADN, en présence d'ARN réplicase permettant sa réplication (Cech, 1989). Il est possible que ces briques élémentaires, diluées au départ, n'aient pu travailler de manière concentrée qu'à partir du moment où elles étaient maintenues au sein d'un même compartiment. La proximité des substrats dans un environnement restreint aurait alors pu favoriser la mise en œuvre des réactions chimiques et enzymatiques simples impossibles dans un environnement plus dilué (Figure 1).

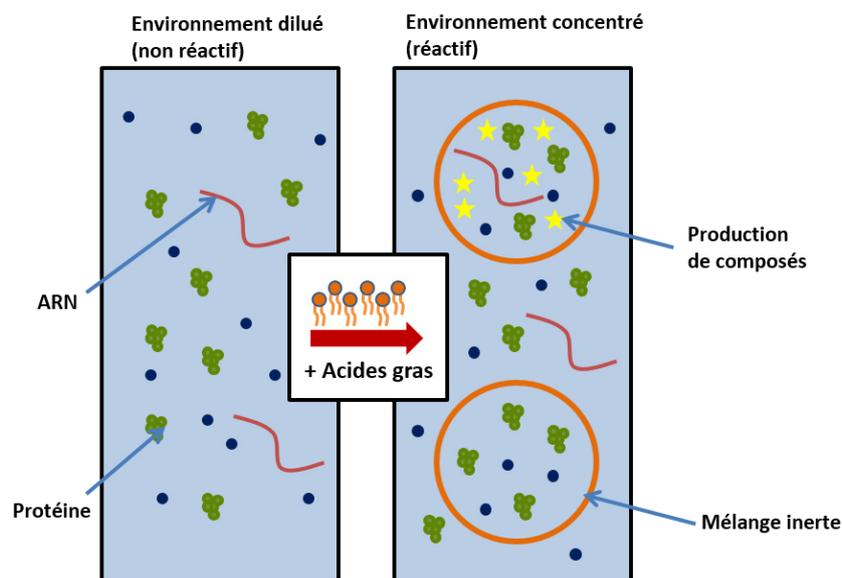


Figure 1 : [Représentation de l'effet de concentration comme modèle de l'apparition des premières cellules.](#)

Les vésicules de lipides sont formées dans un mélange dilué et très peu réactif en ce qui concerne les biomolécules présentes dans le milieu. Du fait de l'assemblage spontané de acides gras en structures vésiculaires, les biomolécules sont encapsulées dans les vésicules. La concentration à l'intérieur du compartiment permet alors aux biomolécules d'interagir entre elles. La séparation des milieux intérieurs et extérieurs permet une conservation au sein du compartiment de tous les composés formés et de toutes les mutations engendrées. L'auto-assemblage des lipides permet aussi statistiquement l'apparition de mélanges non réactifs. Ceci représente un modèle potentiel de l'apparition des premières cellules le plus couramment admis.

Cette étape est vraisemblablement la première étape clé de l'apparition de la vie sur terre sous formes d'objets cellulaires appelés « Protocellules ». De manière spéculative, la cellule la plus simple ayant existé a pu être composée d'une vésicule d'acides gras contenant l'ARN et l'ARN réplicase (Szostak *et al.*, 2001). Ces vésicules auraient alors pu se diviser spontanément de manière mécanique par une augmentation de taille rendant la vésicule instable et plus apte à se diviser (Murtas, 2013). Ces protocellules ont pu alors développer un niveau supérieur de complexification en intégrant un ribozyme capable de synthétiser des nucléotides (Ma et Hu, 2012). L'établissement d'un système de synthèse endogène de membrane a pu ensuite apparaître nécessitant un ribozyme capable de synthétiser des molécules amphiphiles (Ma *et al.*, 2010). Cette étape fondamentale permettant une division plus contrôlée du compartiment marque alors l'arrivée des « Protocellules-vraies ». Cependant, la division pose certains problèmes concernant la répartition du matériel génétique entre les cellules filles. En effet, dans ce modèle, les gènes correspondaient à des entités distinctes les unes des autres en solution. Ceci implique que lors de la division, certains gènes pouvaient être transmis seulement à une des cellules filles et d'autres non. L'apparition du chromosome permettant la structuration de tous les gènes entre eux, facilitant ainsi la transmission aux cellules filles a pu permettre la résolution de ce problème (Smith et Szathmary, 1993). De plus, cette forme de vie pouvait acquérir des mutations conservées au cours du temps sur le chromosome et ainsi permettre l'évolution jusqu'aux cellules modernes selon le schéma évolutif défini par Darwin (Eigen, 1992).

Définir la vie ou en résumer les propriétés fondamentales reste délicat. La vie peut être définie comme la capacité de se reproduire, capacité dictée par un ensemble de molécules informationnelles (Koshland, 2002). Elle peut aussi être définie par la capacité du système à s'auto-entretenir à l'aide des nutriments du milieu extérieur. Depuis l'apparition de la vie sur terre, la cellule comme unité du vivant a évolué. Certaines cellules comme celles des eucaryotes ont complexifié leur fonctionnement et compartimenté leurs réactions.

Cependant, malgré le fait que la cellule ait évolué au sens large, la nature même des mécanismes collaboratifs du vivant est encore mal comprise. Ainsi, pour mieux comprendre la complexité de la cellule, il est important de revenir aux fondements de ces mécanismes et de caractériser les éléments essentiels mis en œuvre pour qu'un assemblage inerte puisse devenir vivant. A l'heure actuelle, la teneur qualitative en éléments nécessaires à la vie n'est pas clairement établie et fait l'objet de nombreuses études depuis un demi-siècle pour essayer de définir la « cellule minimale ».

1) La cellule minimale

La cellule minimale peut être définie comme un système cellulaire possédant les attributs nécessaires et suffisants pour être considéré comme vivant : la cellule minimale doit être capable de maintenir sa structure et de se répliquer (Gil, 2011). L'objectif principal de définir expérimentalement la cellule minimale réside dans une volonté fondamentale de comprendre le vivant. Comment simplifier au maximum la complexité intrinsèque d'une cellule afin d'en dégager les mécanismes fondamentaux est un des enjeux principaux. Simplifier l'ensemble des processus liés au fonctionnement d'une cellule pourrait permettre de mieux appréhender les mécanismes indispensables à l'accomplissement des fonctions vitales d'une cellule. Au-delà de l'aspect fondamental, se cache une réelle ambition d'exploiter le potentiel industriel de la cellule minimale en créant des fonctionnalités cellulaires ciblées pour produire efficacement des molécules d'intérêt dans les domaines de la santé. L'intérêt industriel de la cellule minimale réside dans le fait de produire des systèmes optimisés et simplifiés pour maximiser la production du composé d'intérêt pharmaceutique ou chimique tout en minimisant les besoins énergétiques (Moya *et al.*, 2009).

La première interrogation, lorsque nous observons attentivement la complexité des réactions concernant les cellules les plus simples (bactéries) ainsi que l'organisation de tous les réseaux, est la suivante : Quel est le nombre minimal de molécules à assembler afin de produire un objet vivant. Pour répondre à cette question, deux approches ont émergé : l'approche réductionniste (top-down), qui vise à réduire l'ensemble des composants cellulaires jusqu'à obtenir le nombre minimum et l'approche constructionniste (bottom-up), qui vise à assembler les constituants cellulaires essentiels afin de synthétiser un objet vivant (Figure 2). Ces deux approches ont pour objectif de reproduire des objets vivants selon la définition donnée par Koshland (Koshland, 2002), c'est-à-dire des objets capables (i)de synthétiser leur propre matériel à partir des composants extérieurs et (ii)de se reproduire.

A/ **Approche top down**

Un des points majeurs développé par l'approche top-down concerne le génome, et pose la question suivante : quel est le « set » minimal de gènes permettant l'accomplissement des fonctions vitales d'une cellule ? Afin de répondre à cette question, deux approches complémentaires ont été utilisées. La première, à l'ère des séquençages de génomes, est basée sur de la génomique comparative inter-espèces dans le but de déterminer les similarités au niveau des gènes de plus d'une centaine d'organismes. Cette approche est basée sur le fait que les gènes partagés entre des espèces phylogénétiquement éloignées pourraient être des gènes essentiels. Les résultats montrent qu'une quarantaine de gènes seraient partagés entre 147 espèces(Charlebois et Doolittle, 2004). Ce nombre de gènes est bien entendu insuffisant dans la mesure où de nombreuses fonctions cellulaires peuvent être codées par des gènes non-orthologues. La seconde approche, plus expérimentale vise à déterminer les gènes essentiels d'une espèce par l'utilisation de transposons. Les transposons sont des petites séquences d'ADN qui vont pouvoir s'insérer dans le génome de la bactérie de manière

aléatoire. Cette séquence peut alors inactiver certains gènes et permet de déterminer si ces gènes inactivés sont essentiels à la survie de l'espèce. Chez *Mycoplasma genitalium*, le premier organisme pour lequel cette méthode a été utilisée, 381 gènes considérés comme essentiels ont été dénombrés (Glass *et al.*, 2006). Depuis, cette approche a été très utilisée sur un large spectre d'organismes et a permis de définir différents « sets » de gènes essentiels de taille variable (Juhas *et al.*, 2011). En 2010, l'équipe de John Craig Venter a réussi à synthétiser une copie exacte du génome de *Mycoplasma mycoides* le JCVI-syn1.0 (1079 kpb, 901 gènes)(Gibson *et al.*, 2010) dont la taille a ensuite été réduite pour obtenir le JCVI-syn3.0 (531 kpb, 473 gènes)(Hutchison *et al.*, 2016). Ce génome a ensuite été transplanté dans une bactérie receveuse, *Mycoplasma capricolum*, par une méthode qui avait été mise au point précédemment dans le même laboratoire (Lartigue *et al.*, 2007). La première cellule avec un génome synthétique avait alors été créée. A l'heure actuelle ce génome était encore loin d'être un génome constitué seulement de gènes essentiels ce qui constitue encore l'un des objectifs majeurs de l'approche réductionniste.

B/ Approche bottom up

L'approche bottom-up vise à construire expérimentalement à partir de constituants cellulaires séparés un objet autonome, capable d'effectuer différentes fonctions (Figure 2). L'élaboration de systèmes minimaux par cette approche réside dans l'encapsulation de molécules pour effectuer des actions de production de composés naturels comme l'ADN, les protéines dans un compartiment

L'approche développée par les différents groupes travaillant dans ce domaine consiste à assembler trois blocs moléculaires : l'information génétique, le métabolisme et le compartiment. Séparément, ces trois blocs ont fait l'objet de nombreuses études et sont très

bien caractérisés. Cependant, c'est l'encapsulation du métabolisme ainsi que de l'information génétique au sein d'un compartiment physique qui représente le plus gros obstacle à ce jour (Caschera et Noireaux, 2014).

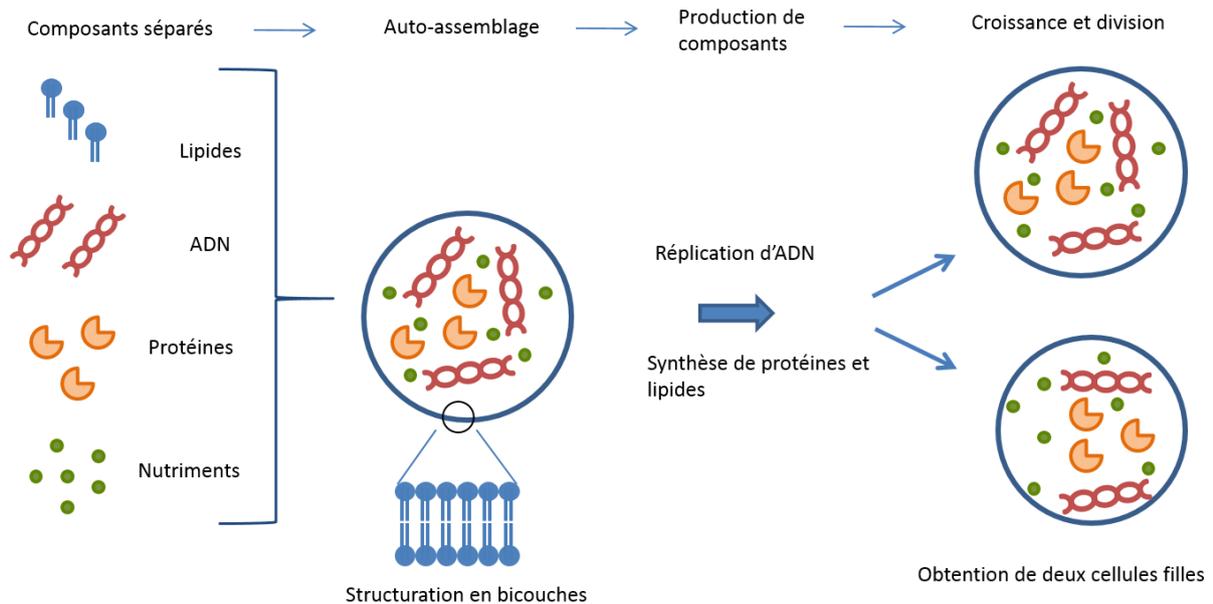


Figure 2 : Approche constructionniste (Bottom up).

L'objectif de l'approche constructionniste est de rassembler au sein d'un même compartiment tous les composants nécessaires à la formation d'un objet vivant. Le compartiment est le plus souvent un assemblage de lipides en solution formant des vésicules au sein desquelles sont encapsulées les molécules essentielles. L'objectif est de permettre la production de matériel génétique et protéique, mais aussi la division du compartiment afin d'obtenir deux compartiments fils.

Le bloc moléculaire qui va nous intéresser dans ce manuscrit concerne le compartiment. Pour le développement de cellules minimales, l'objectif est de rassembler tous les intervenants des réactions biologiques essentielles au sein d'un compartiment (Figure 2). L'encapsulation dans les compartiments est un processus qui a été très étudié non pas pour construire des cellules dans un premier temps, mais plutôt pour vectoriser et délivrer des molécules d'intérêt pharmaceutique (Emmen et Storm, 1987; Kaye et Richardson, 1979; Ostro et Cullis, 1989).

Aujourd'hui les connaissances accumulées sur l'encapsulation permettent de générer des bioréacteurs complexes pouvant encapsuler de grandes variétés de molécules.

La synthèse des protéines à l'intérieur des compartiments est un point essentiel dans l'élaboration de cellules minimales. Elle constitue la première étape nécessaire à l'accomplissement de fonctions complexes comme la division cellulaire. Cette synthèse nécessite la présence d'information génétique, des protéines et des facteurs permettant la transcription et la traduction et des nutriments précurseurs essentiels. Les méthodes utilisées pour synthétiser des protéines sont basées sur les technologies des systèmes cell-free (Caschera et Noireaux, 2014 ; Catherine *et al.*, 2013 ; Zubay, 1973). Ces systèmes acellulaires sont utilisés pour produire des protéines ou des peptides (Gould, 1968; Katz, 1971) et actuellement intégrés à des études de protéomique (Sawasaki *et al.*, 2002 ; Vinarov *et al.*, 2004), de nanotechnologies (Daube et Bar-Ziv, 2013; Heyman *et al.*, 2012 ; Tan *et al.*, 2013) ainsi que dans le domaine de l'industrie (Swartz, 2006). Ces systèmes basés principalement sur des extraits cellulaires d'*E.coli* (Caschera et Noireaux, 2014) sont devenus depuis plusieurs années des standards expérimentaux pour la construction de cellules minimales.

L'avantage de ce système réside dans le fait d'avoir toute la machinerie moléculaire de la bactérie, permettant l'expression des protéines à partir de gènes. La composition exacte de ces systèmes n'est au départ pas connue et donc incontrôlée. Ceci implique que de nombreuses protéines et des acides nucléiques sont présents sans être impliqués dans le processus d'expression de protéines. Par exemple, la présence de protéases et de nucléases interfère et peut même inhiber la synthèse de protéines. Pour résoudre ce problème, l'équipe de Takuya Ueda a mis au point un système reconstitué nommé PURE système (Protein synthesis Using Recombinant Elements). Ce système, issu de l'optimisation de systèmes cell-free, est composé seulement d'éléments nécessaires à la transcription et traduction (Shimizu *et al.*, 2001). *In vitro*, il a été montré que ce système permet d'exprimer des protéines (Shimizu *et al.*, 2001) ; cependant, les taux d'expression avec le système PURE restent inférieurs à ceux

obtenus avec des extraits cellulaires (Hillebrecht et Chong, 2008). En parallèle, d'autres équipes comme celle de Vincent Noireaux optimisent la composition des systèmes cell-free afin d'augmenter la production de protéines (Caschera et Noireaux, 2014). Ces systèmes d'expression constituent donc un outil expérimental exceptionnel pour produire des protéines. Cependant, la difficulté majeure réside dans l'encapsulation de tous ces composés à l'intérieur d'un compartiment pour permettre la synthèse des protéines. C'est pourquoi différents compartiments ont été élaborés afin de réussir ce processus d'encapsulation.

2) Les compartiments

A/ Les compartiments vésiculaires

L'obtention d'un compartiment est le point essentiel pour encapsuler tous les constituants nécessaires à la synthèse des protéines. Dans cette partie, nous allons détailler les différents compartiments étudiés dans une optique de construction de cellules minimales, leurs efficacités pour encapsuler des molécules simples ainsi que des systèmes d'expressions. Nous mettrons alors l'accent sur les avantages de chacun de ces compartiments ainsi que sur leurs limites.

a) Vésicules lipidiques

Le modèle de compartiment le mieux caractérisé à l'heure actuelle est le compartiment vésiculaire. Ce compartiment qualifié de biomimétique, a été décrit pour la première fois par Alec Bangham en 1965 et a vite été considéré comme le modèle le plus intéressant en terme d'encapsulation de biomolécules (Bangham, 1965). Ce compartiment est formé en solution aqueuse par un auto-assemblage de lipides sous la forme de bicouches, appelé aussi liposomes. Cet assemblage crée un espace confiné séparé du milieu extérieur, permettant une encapsulation dite « stricte » des biomolécules. Plus généralement les vésicules de phospholipides comme les membranes biologiques sont perméables à l'eau mais beaucoup moins aux sels et aux composés chargés (Gennis, 1989), l'étanchéité du système étant

dépendante de sa composition. Les vésicules peuvent être de taille hétérogène (de 50 nm à 100µm) et présenter plusieurs bicouches superposées (Figure 3). Elles sont utilisées depuis les années 1970 pour l'encapsulation d'enzymes (Sessa et Weissmann, 1970) et pour la délivrance d'une grande variété de principes actifs pharmacologiques (Gregoriadis, 1972). Ce modèle est aussi largement utilisé dans les processus de transfert de gènes, notamment grâce à sa capacité à fusionner avec les membranes des cellules (Felgner *et al.*, 1987 ; Whitt *et al.*, 2001 ; Young *et al.*, 2002).

Malgré le fait que ces compartiments soient considérés comme biomimétiques et largement utilisés pour encapsuler des biomolécules, il existe de nombreuses difficultés dans l'encapsulation de mélanges protéiques plus complexes (Système cell-free, système PURE). Pour commencer, la présence d'une bicouche quasiment imperméable aux molécules de taille proches des protéines ne permet pas une encapsulation par diffusion depuis le milieu extérieur. L'incorporation de molécules à l'intérieur de vésicules nécessite la mise en place de méthodes expérimentales spécifiques qui sont séparées en deux catégories. Les méthodes spontanées et les méthodes dirigées.

Les méthodes spontanées regroupent majoritairement les méthodes dérivées de l'hydratation de films lipidiques, tandis que les méthodes dirigées regroupent les méthodes de transfert d'émulsions en solution ou à l'aide d'appareils de micro-fluidique. Il demeure évident que les taux d'encapsulation dans les vésicules sont intrinsèquement liés à la méthode expérimentale utilisée.

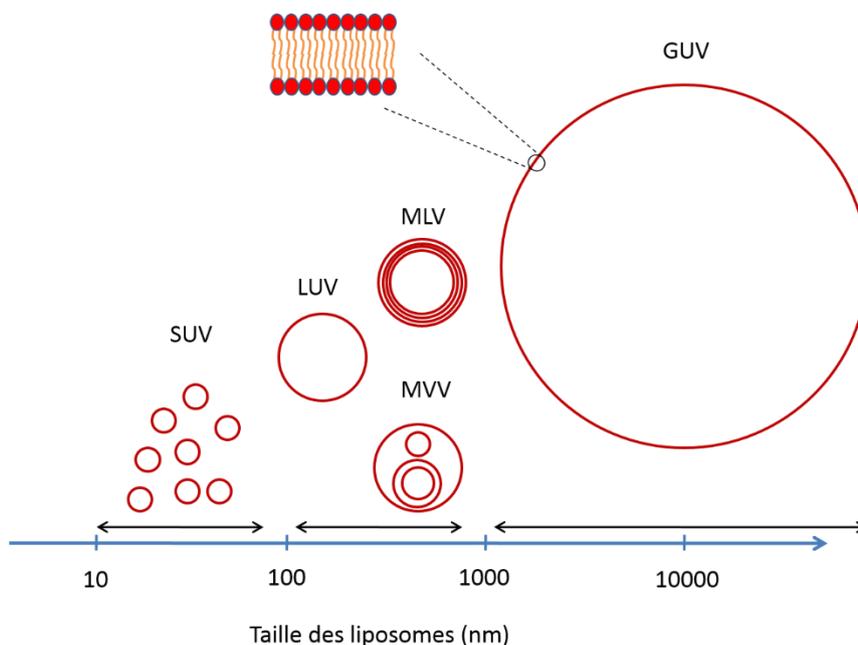


Figure 3 : Représentation des différentes vésicules.

Les vésicules de lipides peuvent posséder des morphologies et des tailles différentes. Ces différences sont intrinsèquement liées à la méthode de préparation des vésicules. SUV : Small unilamellar vesicles, LUV : Large unilamellar vesicles, MLV : Multilamellar vesicles, MVV : Multivesicular vesicles et GUV : Giant unilamellar vesicles.

i. Méthodes de préparation

Hydratation d'un film lipidique

Expérimentalement, la méthode la plus utilisée afin d'encapsuler des solutés à l'intérieur d'une vésicule reste l'hydratation d'un film lipidique par un solvant aqueux contenant les molécules à encapsuler (Figure 4)(Bangham, 1965). Les lipides sont dans un premier temps solubilisés dans un solvant organique. Le solvant est ensuite évaporé ce qui conduit à la formation d'un film lipidique à la surface du contenant. Ce film lipidique est ensuite hydraté avec une solution contenant la molécule d'intérêt à encapsuler entraînant la formation de vésicules. Cette méthode est qualifiée de spontanée dans la mesure où les événements d'encapsulation dépendent des interactions moléculaires entre les lipides et les solutés. Ceci signifie que les teneurs qualitatives et quantitatives de solutés à l'intérieur des vésicules ne peuvent être contrôlées et équivalentes d'une vésicule à une autre. L'encapsulation de

grandes variétés de molécules uniques à l'intérieur d'un ensemble de vésicules a largement été montré (Colletier *et al.*, 2002 ; Schumacher *et al.*, 1999 ; Xu *et al.*, 2012). Les taux d'encapsulation de molécules uniques, majoritairement des protéines, varient entre 1 et 40% en fonction de la méthode utilisée (Walde et Ichikawa, 2001). Il est important de noter que ces taux d'encapsulation restent faibles vis-à-vis des taux d'encapsulation obtenus avec d'autres méthodes ou d'autres compartiments détaillés plus tard.

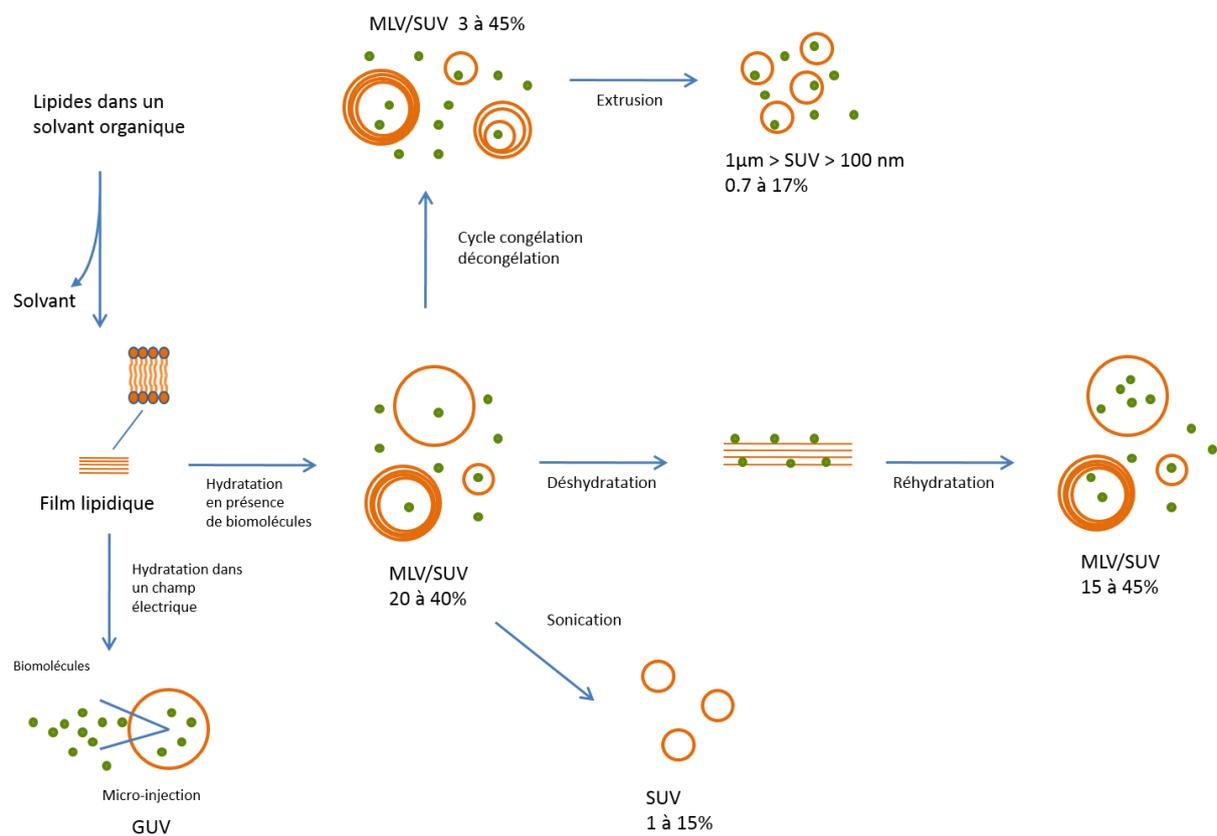


Figure 4 : Résumé des méthodes utilisées pour la préparation de vésicules basées sur l'hydratation d'un film lipidique.

Ce schéma représente les principales méthodes basées sur l'hydratation de films lipidiques. Les abréviations utilisées sont les suivantes. GUUV : Giant unilamellar vesicles, MLV : Multilamellar large vesicles, SUV : Small unilamellar vesicles. Les nombres présents sous le type de vésicules indiquent les taux d'encapsulation obtenus avec la technique correspondante. Les lipides sont solubilisés dans un solvant organique. Le solvant est ensuite évaporé ce qui conduit à la formation d'un film lipidique à la surface du contenant. Le film lipidique est ensuite hydraté par une solution contenant la molécule à encapsuler. Les vésicules obtenues demeurent très hétérogènes avec une distribution de taille et de lamellarité peu reproductible. Cette méthode représente le plus souvent la première étape de préparation de vésicules plus homogènes par sonication, cycles de congélation/décongélation ou extrusion.

Dans le cas de l'encapsulation de systèmes cell-free, la difficulté pour encapsuler les nombreuses protéines et molécules présentes dans ces systèmes par cette méthode est très importante. Statistiquement, La méthode d'hydratation de films lipidiques permet un nombre d'événements d'encapsulation de 80 molécules différentes (Système PURE) de l'ordre de 10^{-26} au sein d'une vésicule de 200 nm (Souza, 2009). Ce phénomène d'encapsulation est largement dépendant de la taille des vésicules ce qui explique l'intérêt majeur des liposomes géant pour ce type d'encapsulation (Kuruma *et al.*, 2009; Oberholzer *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2001) (Tableau 1). Malgré le fait que le volume des liposomes géants soit plus important ce qui permet l'incorporation de plus grandes quantités de matériel, l'absence de reproductibilité dans les processus d'encapsulation de tous les composés constitue toujours à l'heure actuelle une limite importante (Walde *et al.*, 2010).

Transfert d'émulsion

Les techniques de formation de liposomes par transfert d'émulsions sont qualifiées de « dirigées » dans la mesure où l'encapsulation à l'intérieur des vésicules est forcée. Elles consistent en la production d'émulsions eau dans huile à partir d'une solution aqueuse contenant l'ensemble des molécules à encapsuler (Pautot *et al.*, 2003) (Figure 5).

Méthode de formation

Le matériel dispersé initialement dans la phase aqueuse se retrouve séquestré dans les gouttes d'émulsion eau dans huile. Une fois ces gouttes formées, elles sont centrifugées afin de permettre leur passage à travers une interface huile/eau qui entraîne la formation d'une bicouche autour de la goutte par appareillage du feuillet de lipides présents à l'interface (Figure 5). Idéalement, cette méthode dépasse la grande limitation évoquée précédemment sur les méthodes d'hydratation des films lipidiques. Elle permet la formation de vésicules de

5-50 μm dont le taux d'encapsulation est de 95-100%. De plus, les volumes importants des gouttes d'émulsions produites, permettent d'avoir une population dont le contenu reste homogène (Yamaji *et al.*, 2009). La difficulté principale de ces systèmes réside dans le fait que peu de vésicules sont formées au cours du processus. Comme le montre la figure 5, de nombreuses gouttes d'émulsion vont se casser au cours du passage de la couche interfaciale en fonction du composé encapsulé ainsi que de la nature de la phase huileuse (Ohno *et al.*, 2009). De plus, il est nécessaire de supprimer la présence de phase huileuse au niveau de la bicouche qui pourrait alors interférer sur la présence et l'activité de protéines membranaires encapsulées.

Encapsulation de biomolécules

L'expression de protéines par des systèmes cell-free dans ces vésicules a été montré il y a plus de 10 ans (Noireaux et Libchaber, 2004). Cependant, les études montrent que le nombre de vésicules formées dans lesquelles des protéines sont synthétisées reste encore faible (Souza, 2009). Ceci peut être expliqué par le fait que la richesse protéique des systèmes d'expression cell-free dans les gouttes d'émulsion modifie le rapport des forces lors du passage de la goutte sur la monocouche interfaciale ce qui entraîne le relargage du contenu protéique dans la phase aqueuse. De plus, d'autres observations expérimentales montrent que la présence d'ADN ainsi n'est pas homogène dans toutes les vésicules ce qui explique que même parmi les vésicules formées, très peu expriment la protéines (Caschera et Noireaux, 2016).

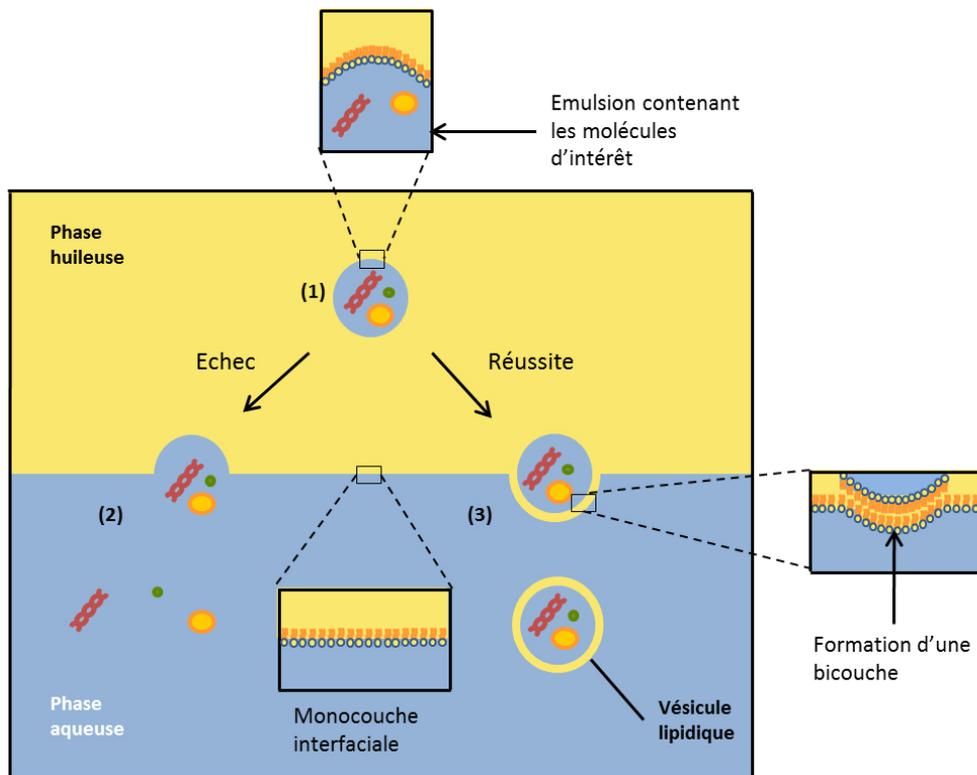


Figure 5 : La méthode de transfert d'émulsions.

(1) Une émulsion eau dans huile est préparée avec la solution aqueuse contenant les molécules d'intérêt. Les gouttes d'émulsion formées vont migrer vers la phase aqueuse à l'aide d'une étape de centrifugation ou du fait de la différence de densité entre les deux phases et rencontrer le feuillet de la monocouche interfaciale, deux cas peuvent se produire. (2) Dans ce cas, le feuillet lipidique de la goutte fusionne directement avec le feuillet interfacial ce qui a pour conséquence le relargage du contenu dans la phase aqueuse. Ce phénomène est dépendant de la nature des lipides ainsi que de la nature des composants de la phase aqueuse. (3) Dans ce cas, il y a appareillage du feuillet de la goutte d'émulsion au feuillet interfacial après une étape de centrifugation, entraînant la formation d'une bicouche (Pontani *et al.*, 2009).

Certaines équipes ont pu mettre en évidence l'expression de systèmes cell-free dans une centaine de liposomes obtenus avec cette méthode (Saito *et al.*, 2009)(Tableau 1). L'ensemble de ces observations montrent que, malgré un avantage indéniable en terme de taux d'encapsulation, le nombre de vésicules dans lesquelles l'ensemble des constituants demeure faible

Tableau 1: Liste des travaux sur la synthèse de protéines dans des vésicules

Mix de lipides₁: PC/Cholestérol/DSPE-PEG5000(1.5/1/0.08), Mix de lipides₂:
 POPC/PLPC/SOPC/SLPC/Cholestérol/DSPE-PEG5000(129/67/48/24/180/14), Mix de lipides₃:
 POPC/POPE/POPG/Cardiolipine (58/39/3), Mix de lipides₄: POPC/Cholestérol/DSPE-
 PEG5000(58/39/3) T&T : Transcription et traduction, GFP : Green Fluorescent Protein.

Lipides	Méthode	Template	T&T kit	Produit	Détection	Réf
Mix de lipides ₁	Film lipidique	ADN	Extraits cellulaires	GFP	Microscopie à fluorescence	(Oberholzer et al., 1999)
POPC	Injection	ADN	Extraits cellulaires	GFP	Microscopie à fluorescence	(Oberholzer et Luisi, 2002)
DOPC/ DOPG	Film lipidique	ADN	Extraits cellulaires	GFP	Microscopie à fluorescence	(Nomura et al., 2003)
Mix de lipides ₂	Film lipidique	ADN (2 gènes)	Extraits cellulaires	T7 RNA Polymérase et GFP	Cytométrie en flux	(Ishikawa et al., 2004)
PC	Transfert d'émulsions	ADN (2 gènes)	Extraits cellulaires	α -hémolysine et GFP	Microscopie à fluorescence	(Noireaux et Libchaber, 2004)
Mix de lipides _{3,4}	Film lipidique	ADN (2 gènes)	Système PURE	GFP	Cytométrie en flux	(Sunami et al., 2006, 2010)
POPC	Film lipidique	ADN	Système PURE	GFP	Microscopie à fluorescence	(Murtas et al., 2007)
PC	Transfert d'émulsion	ADN	Système PURE	GFP	Microscopie à fluorescence	(Saito et al., 2009)
Mix de lipides ₄	Film lipidique	ADN	Système PURE	GFP	Microscopie à fluorescence	(Kuruma et al., 2009)
Mix de lipides ₅	Film lipidique	ARN	Système PURE	β -Galactosidase et Q β -Réplicase	Cytométrie en flux	(Kita et al., 2008)
DOPC	Transfert d'émulsions	ARN	Extraits cellulaires	GFP	Microscopie à fluorescence	(Yamaji et al., 2009)

Préparation de liposomes assistée par microfluidique

La microfluidique

La microfluidique est une technologie qui vise à la manipulation contrôlée de petits volumes (de l'ordre du nanolitre) à travers des capillaires de taille très faible. Cette technologie, encore très récente, a été développée conjointement avec la miniaturisation des systèmes et représente une alternative viable dans tous les projets qui visent à élaborer expérimentalement une cellule minimale. L'intérêt suscité par cette technologie vient du fait qu'elle permet de générer des compartiments calibrés (Casadevall i Solvas et de Mello, 2011) utilisés comme bioréacteurs (Schaerli *et al.*, 2009 ; Sokolova *et al.*, 2013), comme plate-forme de screening (Wang *et al.*, 2014) ou pour l'étude du vivant à l'échelle d'un organisme unique (Najah *et al.*, 2014 ; Tam *et al.*, 2014). En ce qui concerne l'approche bottom-up, les gouttes d'émulsions eau/huile sont utilisées comme précurseurs de vésicules. Ces gouttes sont générées dans des capillaires par un flux de phase aqueuse traversant une phase huileuse (Figure 6A). La taille des gouttes est déterminée par le flux ainsi que par la taille du capillaire. Cette technologie permet la formation de gouttes homogènes (3% de coefficient de variation) présentant une forte variabilité de taille (500 nm à 500 µm) (Carreras *et al.*, 2015). Les taux d'encapsulation restent très proches de 100% ce qui a permis la mise en évidence d'expression de protéines basé sur des systèmes cell-free dans ces gouttes d'émulsions (Courtois *et al.*, 2008; Dittrich *et al.*, 2005). Malgré le fait que ces gouttes d'émulsion puissent servir de

compartiment pour des réactions de synthèse, la nature même d'une émulsion eau/huile paraît peu compatible à l'élaboration du vivant. C'est pourquoi l'intérêt majeur de leur utilisation réside dans la formation de vésicules.

La méthode la plus utilisée pour former des vésicules à partir de gouttes d'émulsion reste la méthode de transfert d'émulsions décrite précédemment (Figure 6B)(Hu *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 2006). L'intérêt de la microfluidique pour la préparation de liposome réside dans le fait qu'en amont, les gouttes d'émulsions sont calibrées ce qui permet d'avoir plus de reproductibilité dans la formation de liposomes. Malgré ces avantages indéniables en terme de calibration, le nombre de vésicules générées reste toujours bien plus faible que ceux obtenus avec les méthodes d'hydratation de films lipidiques.

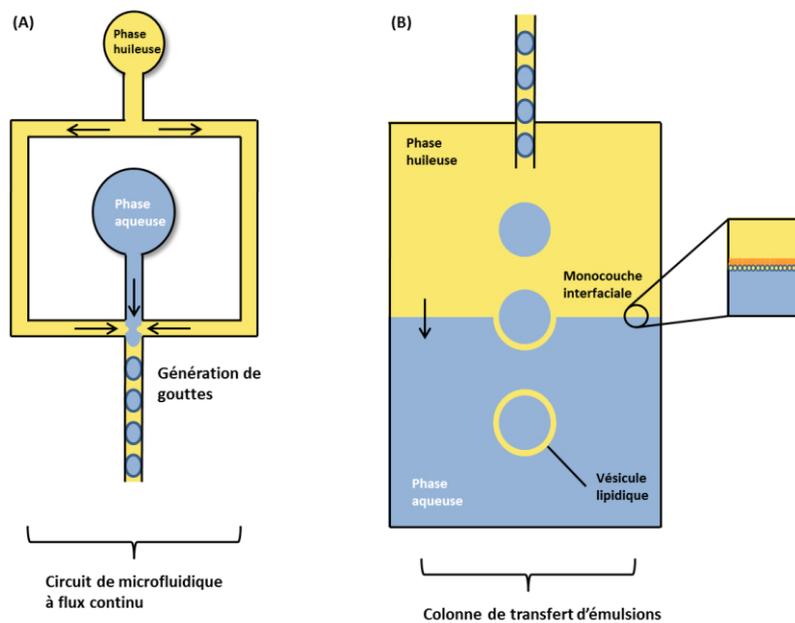


Figure 6 : Génération de vésicules par un système de micro-fluidique

Formation de gouttes et de vésicules par un système de microfluidique. (A) Représentation d'un circuit de microfluidique permettant la formation de gouttes. Les phases huileuses et aqueuses sont séparées. Les flèches indiquent le sens du flux pour chacune des deux phases. Les gouttes sont formées dans le capillaire par le flux continu de phase aqueuse à travers le circuit contenant la phase huileuse. (B) Représentation d'une colonne de transfert d'émulsions. Les gouttes chargées en sucrose traversent une phase huileuse. Au moment où les gouttes atteignent la monocouche interfaciale, un deuxième feuillet lipidique se forme à la surface du premier ce qui permet la formation d'une vésicule. Ceci est une représentation d'un double module, les gouttes sont formées sur le premier module puis récupérées avant d'être envoyées sur le second module.

La première expression de protéines dans ces systèmes a été récemment démontrée (Elani *et al.*, 2015). Il est cependant important de noter que le taux de formation de vésicules en présence de système cell-free est très faible (12%). Ceci peut être expliqué par la concentration importante de molécules présentes dans les systèmes cell-free (2.3 mg/ml) qui, de la même façon que pour la méthode de transfert d'émulsion, modifie le rapport des forces mises en jeu lors de l'appareillage des feuillettes entre eux et peut entraîner un relargage des composés dans la phase aqueuse (Friddin *et al.*, 2013). Cependant, l'intérêt de la microfluidique permet d'aller beaucoup plus loin : Il a été montré que des systèmes composés de doubles ou de triples vésicules pouvaient être formés (Figure 7). Ces doubles vésicules sont capables d'exprimer, dans chacun des compartiments, différentes protéines (Elani *et al.*, 2015). Les compartiments peuvent communiquer entre eux *via* la formation de pores entre les membranes (Elani *et al.*, 2014). Ces travaux ouvrent la voie à la construction de systèmes beaucoup plus compartimentés permettant une séparation des réactions chimiques et un échange inter-compartiment proche du fonctionnement des cellules eucaryotes.

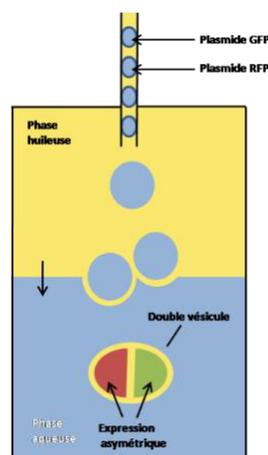


Figure 7 : Expression asymétrique de protéines dans des doubles vésicules.

Représentation d'une vésicule multi-compartiments formée à l'aide de gouttes d'émulsion comme précurseurs. Chaque compartiment est séparé et contient un ensemble de molécules différent. Dans la première goutte d'émulsion, l'ensemble du système d'expression de protéines ainsi qu'un plasmide exprimant la Green Fluorescent Protein (GFP) sont séquestrés. Dans la seconde goutte d'émulsion, le système d'expression de protéines est séquestré avec un plasmide exprimant la Red Fluorescent Protein (RFP). Chacun des compartiments est capable d'exprimer des protéines différentes. Des pores peuvent être assemblés à l'interface entre les deux vésicules permettant un échange de matériel.

Autres méthodes

D'autres méthodes sont basées sur le mélange d'une solution de solvants (éthanol, éther) contenant des lipides avec une solution aqueuse dans laquelle les molécules à encapsuler sont solubilisées (Figure 8). Ces méthodes présentent plusieurs limites comme l'utilisation d'un solvant organique pour produire des vésicules, incompatible avec la réalisation de réactions enzymatiques dans les vésicules. De plus, cette méthode ne permet pas de former beaucoup de vésicules à moins d'utiliser de grandes quantités de solvants. Cette technique a cependant largement été utilisée pour encapsuler des molécules simples mais ne constitue pas aujourd'hui une méthode viable pour l'encapsulation de systèmes d'expressions plus complexes.

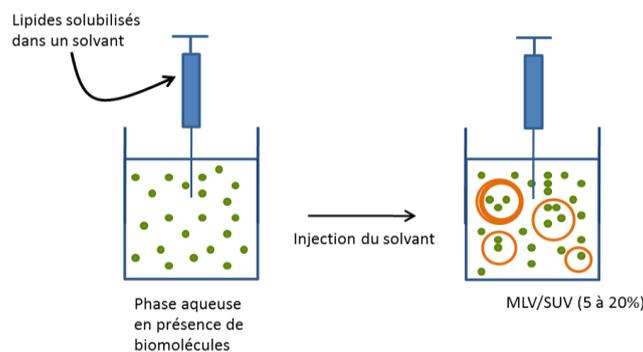


Figure 8 : Méthode d'encapsulation de biomolécules par l'utilisation de solvants.

La phase aqueuse contient les molécules à encapsuler. Un solvant contenant les lipides est ensuite ajouté à la phase aqueuse. Les lipides forment alors des vésicules permettant l'encapsulation des biomolécules

D'autres méthodes utilisent des détergents pour solubiliser des lipides. Le détergent est ensuite enlevé par dialyse, les micelles de détergents tendent à se concentrer en lipides jusqu'à former des liposomes géants. Cette méthode demeure très reproductible dans la formation de liposomes. Cependant, dans la plupart des cas, il reste du détergent au niveau des membranes pouvant avoir un effet sur la conformation des protéines encapsulées. Des techniques plus lourdes de chromatographies ou de dialyses permettent d'enlever le surplus

de détergents. Comme la méthode des solvants, cette méthode n'a jamais permis de mettre en évidence des réactions métaboliques ainsi que des synthèses de protéines.

ii. Division du compartiment

Un des objectifs principaux dans la construction de cellules minimales réside dans la division des compartiments afin d'obtenir deux compartiments dans lesquels le matériel a pu être séparé. Les vésicules de lipides, de par leur nature proche des membranes biologiques, ont fait l'objet de nombreuses études visant à mettre en évidence la division de ces compartiments. La principale approche utilisée pour mettre en évidence le processus consiste en l'incorporation de lipides ou d'acides gras dans la membrane des vésicules. L'incorporation de lipides ou d'acides gras au niveau des vésicules induit un grossissement de la vésicule suivie d'une division liée à une augmentation du rapport surface/volume entropiquement défavorable. Les deux méthodes principalement utilisées consistent en (i) un apport endogène de lipides synthétisés à l'intérieur de la vésicule par l'encapsulation des enzymes nécessaires à la synthèse de lipides (Murtas, 2010; Takakura et Sugawara, 2004) et (ii) en un apport exogène d'acides gras sous forme de micelles qui vont pouvoir nourrir en acides gras les vésicules (Svetina, 2009) (Figure 9).

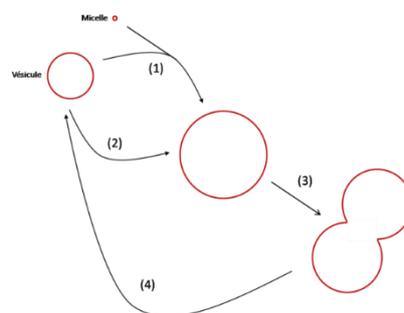


Figure 9 : Mécanismes de divisions de vésicules.

(1) Cette étape consiste à nourrir la vésicule à l'aide d'un apport externe d'acides gras ou de lipides. (2) La seconde manière de fournir plus de lipides dans la membrane consiste à faire la synthèse à l'intérieur de la vésicule d'acides gras ou de lipides. Ces étapes permettent à la vésicule d'augmenter son diamètre. (3) Le rapport surface-volume augmente en conséquence et ne permet plus le maintien de la structure : (4) la vésicule se divise en deux vésicules filles.

En ce qui concerne les vésicules de lipides, la méthode de synthèse endogène est aujourd'hui la plus utilisée. L'encapsulation des différentes enzymes ainsi que des précurseurs a permis de rétablir la voie de biosynthèse permettant la formation de phosphatidylcholine (Figures 10). Il a été ainsi montré, à partir de l'encapsulation par micro-injection de quatre enzymes, la synthèse à l'intérieur des vésicules de phosphatidylcholine ainsi que son incorporation dans la membrane (Wick et Luisi, 1996). Néanmoins, ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence une division de vésicules.

Glycérol-3-Phosphate

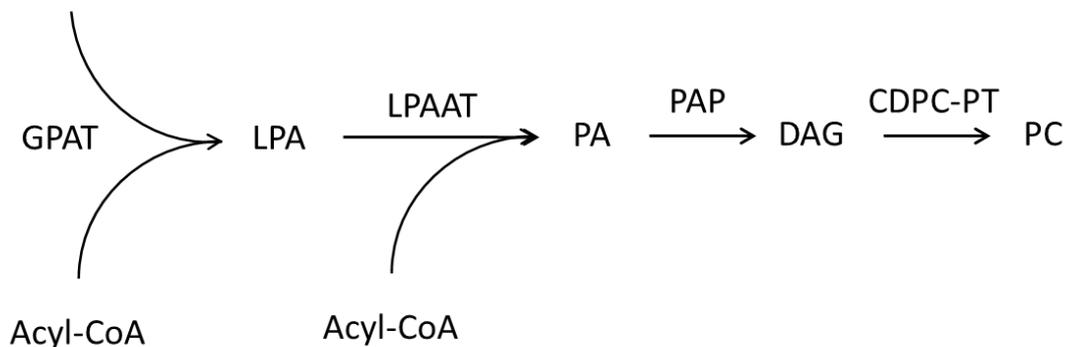


Figure 10 : Réactions permettant la synthèse de phosphatidylcholine.

L'enzyme Glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) permet d'ajouter un acyl-coenzymeA (Acyl-CoA) au niveau du phosphate du glycérol-3-phosphate (G3P) ce qui forme de l'acide lysophosphatidique (LPA). Un deuxième acyl-CoA est incorporé au niveau du LPA par l'enzyme LPA acyl transférase (LPAAT) pour former de l'acide phosphatidique (PA). La phosphatidate phosphatase (PAP) transforme le PA en Diacyl-glycérol (DAG) qui est à son tour transformé en phosphatidylcholine par l'enzyme Cytidinephosphocholine transférase (CDPC-PT).

Cette méthode a été largement réutilisée et optimisée via la synthèse à l'intérieur des vésicules des enzymes nécessaires à la synthèse de lipides. Les enzymes GPAT et LPAAT ont été synthétisées en présence de systèmes cell-free dans les vésicules afin de former de l'acide phosphatidique dans les vésicules (Figure 9). La phosphatidylcholine formée est intégrée dans la membrane (Kuruma *et al.*, 2009). Cependant les faibles rendements de synthèse et d'incorporation du précurseur dans les vésicules ne peuvent mettre en évidence une division vésiculaire claire ce qui constitue à l'heure actuelle la limite de ces méthodes. Pour cela, des

approches utilisant des transporteurs (acyl transporteurs) des précurseurs de lipides pourraient émerger afin de faciliter l'entrée du précurseur de lipides dans les vésicules.

D'autres approches alternatives à la synthèse de lipides existent et sont basées sur l'utilisation des systèmes de divisions bactériens ou eucaryotes dans des vésicules. La reconstitution dans les vésicules de systèmes basés sur de l'actine ou de la tubuline a été montrée mais aboutit seulement à la déformation structurale des membranes (Miyata *et al.*, 1999). D'autres systèmes enzymatiques comme le système de fission des membranes des endosomes aboutit au même constat (Wollert *et al.*, 2009). Dans certains cas, l'expression de protéines permettant la compression des membranes permet d'observer la division des vésicules. Cependant, elle reste anecdotique en comparaison avec l'ensemble de la population de vésicules et peu reproductible (Osawa et Erickson, 2013).

L'importance de la division du compartiment réside en majeure partie sur la séparation égale du matériel génétique présent initialement dans la vésicule mère. C'est seulement récemment que des études ont pu montrer la division de vésicules corrélée à une séparation de matériel génétique (Kurihara *et al.*, 2011). Dans le cadre de cette étude, l'ADN est amplifié par PCR dans une vésicule de phospholipides. Cet ADN est capable d'interagir avec des molécules amphiphiles chargées positivement dans la membrane. Lors de l'interaction entre ADN et lipides, la vésicule se déforme ce qui aboutit à la formation d'une vésicule fille dans laquelle se trouve l'ADN en question. Ces travaux montrent pour la première fois une division cellulaire couplée à une séparation de l'ADN amplifié et proposent ainsi un modèle de cellule minimale avancé.

L'ensemble de ces résultats montrent clairement que la division de vésicules basées sur des lipides reste une étape limitante dans la construction de cellules minimales.

b) Vésicules d'acides gras

Les vésicules d'acides gras sont des systèmes qui ont été mis en évidence pour la première fois par Gebicki et Hicks en 1973 avec des acides oléique et linoléique (Gebicki et Hicks, 1973). Depuis les systèmes vésiculaires basés sur des acides gras ont été largement mis en évidence et plus particulièrement avec les acides gras saturés à courtes chaînes (Cistola *et al.*, 1988 ; Hargreaves et Deamer, 1978 ; Morigaki, 2007). Ce sont des molécules amphiphiles possédant une tête polaire et une queue hydrophobe. Ils constituent un élément structural important des membranes biologiques ce qui en fait un excellent modèle biomimétique pour l'élaboration de cellules minimales. De plus, les vésicules d'acides gras constituent un excellent modèle de compartiments pour les protocellules de par leur simplicité structurale ainsi que leur présence dans la soupe pré-biotique (Naraoka *et al.*, 1999 ; Yuen, 1981). Pour finir, les vésicules d'acides gras sont capables d'incorporer facilement des acides gras exogènes dans leurs membranes pouvant entraîner des phénomènes de divisions vésiculaires (Chen et Szostak, 2004).

i. Méthode de formation

La formation de vésicules d'acides gras est dépendante essentiellement de la capacité des acides gras à s'assembler en solution sans cristalliser. De manière générale, l'auto-assemblage des acides gras est dépendant du pH, de la température ainsi que de la nature du contre-ion présent. Chez les tensio-actifs, le point de Krafft définit la température au-dessus de laquelle le tensio-actif est soluble. Sous forme de sels de sodium ou de potassium, les acides gras sont capables d'adopter des structures micellaires au-dessus du point de Krafft (Sodium palmitate : 60°C) mais cristallisent à température ambiante (Cistola *et al.*, 1986). La nature du contre-ion joue un rôle prépondérant dans l'abaissement du point de Krafft. Ainsi, des contre-ions comme le tétrabutylammonium (Zana, 2004), la choline (Klein, 2008), la guanidine (Douliez *et*

al., 2010) ont été récemment utilisés pour diminuer le point de Krafft (Choline palmitate : 10°C) et permettre d'empêcher la cristallisation à température ambiante.

Le pH est déterminant dans la capacité des acides gras à former des vésicules (Vautrin *et al.* 2004) à partir de micelles allongées dans la mesure où il existe une gamme de pH favorable à la formation de vésicules. Le pH modifie alors le ratio d'acides gras protonés/ionisés au niveau des micelles ce qui permet la formation de vésicules (Cistola *et al.*, 1988) (Figure 11). La gamme de pH pour la formation de vésicules, qui se situe principalement entre 7 et 9, dépend essentiellement de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras.

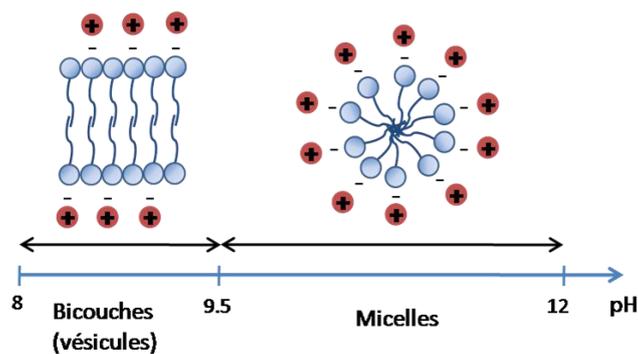


Figure 11 : Rôle du pH dans l'auto-assemblage des acides gras.

Les valeurs de pH permettant la formation de micelles et de vésicules sont indiquées. Ce schéma représente la molécule d'acide gras en bleu ainsi que le contre-ion en rouge. Lorsque le pH est alcalin, l'ionisation des acides gras est favorable à la formation de micelles. Lorsque le pH diminue vers la valeur du pKa des fonctions carboxyliques, la quantité d'acides gras ionisés diminue et favorise la formation de bicouches. Les valeurs sont basées sur un système d'acide oléique/oléate issues des travaux de Cistola *et al* (Cistola *et al.*, 1988).

Cette méthode a permis de mettre en évidence récemment des vésicules formées avec des acides gras à longues chaînes en présence de guanidine (Douliez *et al.*, 2016). Les deux composés interagissent de manière électrostatique et bidentate, empêchant la cristallisation des acides gras (Figure 12). A 21°C, ce système forme des micelles allongées (Fameau *et al.*, 2011) à un pH compris entre 8.5 et 11 et des bicouches superposées sous l'effet du

refroidissement (Douliez *et al.*, 2010). En diminuant le pH vers des valeurs comprises entre 7.5 et 8.5, les acides gras forment des vésicules hétérogènes en taille comprise entre 200 nm et 0.5 μm .

D'autres méthodes utilisant des alcools à courtes chaînes carbonées sont utilisées pour former des vésicules (Apel *et al.*, 2002). La présence d'alcools permet de stabiliser la formation de membrane de par leur structure amphiphile (Monnard *et al.*, 2002) à des pH bien supérieurs à la gamme de pH nécessaire initialement (Stano et Luisi, 2013). Pour finir, des méthodes d'hydratation de films d'acides gras analogues à celles des vésicules de lipides existent (Zhu *et al.*, 2013), la seule contrainte étant que le tampon utilisé doit être proche du pKa de l'acide gras.

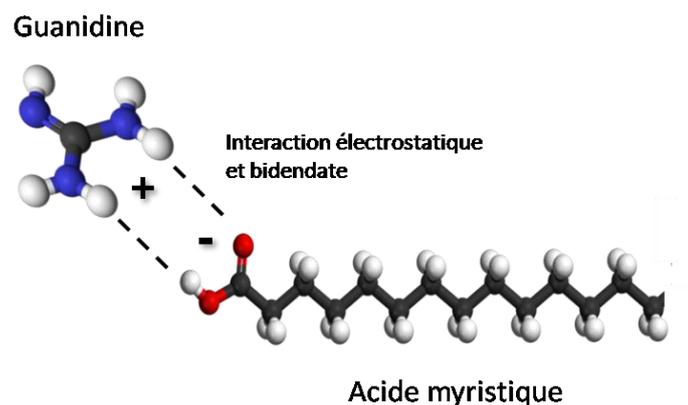


Figure 12 : [Interaction entre la guanidine et l'acide myristique.](#)

L'interaction électrostatique entre les deux composés se fait *via* la tête polaire de l'acide gras et la charge positive des amines de la guanidine. La liaison hydrogène bidentate entre les oxygènes et les azotes vient renforcer l'interaction entre les deux composés.

ii. Encapsulation de biomolécules

Les vésicules d'acides gras possèdent des propriétés différentes des vésicules de lipides qui ont une influence sur l'encapsulation de biomolécules. Les membranes d'acides gras sont beaucoup plus perméables aux molécules chargées, en particulier aux nucléotides ce qui

facilite la synthèse d'oligonucléotides au sein de la vésicule par diffusion du nucléotide depuis le milieu extérieur (Mansy *et al.*, 2008). De plus, l'encapsulation d'enzymes fonctionnelles (Apel *et al.*, 2002; Mansy *et al.*, 2008; Walde, 1994) et de polymères (Apel *et al.*, 2002) a aussi été montrée dans des vésicules d'acides décanoïque.

En ce qui concerne l'encapsulation de systèmes de synthèse de protéines, les vésicules d'acides gras présentent plusieurs inconvénients qui expliquent l'absence de synthèse de protéines à l'intérieur de ces compartiments. Les vésicules d'acides gras sont beaucoup moins robustes que les vésicules de phospholipides : la présence d'ions divalents comme le magnésium, qui représente un cofacteur fondamental pour l'expression des protéines, entraîne la précipitation des acides gras à des concentrations très inférieures à celles des systèmes cell-free. Par conséquent, les vésicules composées seulement d'acides gras sont peu utilisées au profit de vésicules mixtes. L'ajout d'alcools à longues chaînes carbonées, en plus de favoriser la formation de vésicules à partir de micelles, stabilise les vésicules en conditions alcalines⁸¹. Les alkyls amines quant à eux sont capables de stabiliser des vésicules d'acides gras en présence d'ions divalents ce qui ouvre à l'heure actuelle de nombreuses perspectives pour de l'expression de protéines (Namani et Deamer, 2008). L'inconvénient des systèmes mixtes réside cependant dans l'utilisation de molécules amphiphiles comme des alcools qui peuvent avoir un impact sur des processus comme la synthèse des protéines (Hong-Brown *et al.*, 2001) ce qui peut expliquer qu'à ce jour aucune expression de protéines à l'intérieur de vésicules d'acides gras n'a été mise en évidence.

iii. Division du compartiment

De par leurs différences structurales, les vésicules d'acides gras constituent un bien meilleur modèle pour la mise en évidence de divisions que les vésicules de lipides. En effet, la dynamique des vésicules d'acides gras est beaucoup plus importante que celle des vésicules de phospholipides (McLean et Phillips, 1981). Ceci permet une incorporation facile d'acides

gras exogènes (micelles) principalement dû à la petite taille de la partie hydrophobe de l'acide gras. Ainsi, l'énergie hydrophobe nécessaire pour intégrer l'acide gras dans la membrane reste bien inférieur à celle des phospholipides.

Les acides gras constituent ainsi le modèle le plus intéressant pour étudier la division de compartiment par un apport extrinsèque d'acides gras (Svetina, 2009). L'incorporation d'acides gras au niveau de la bicouche des vésicules a été montrée et permet la croissance des vésicules (Hanczyc *et al.*, 2003 ; Rogerson *et al.*, 2006) ainsi que leur division (Luisi *et al.*, 2004). Des micelles d'acides oléique permettent l'échange d'acides gras avec les vésicules ce qui entraîne la formation à leur surface de protubérances. La vésicule initialement sphérique est transformée en vésicule allongée, ces vésicules sont agitées et permettent la formation de vésicules filles (Figure 13). L'inconvénient de ce processus est la perte de 40% du matériel encapsulé préalablement au cours de l'agitation (Zhu et Szostak, 2009).

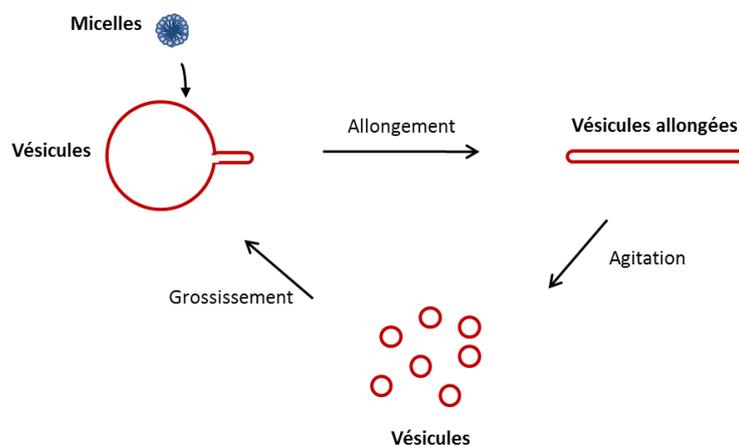


Figure 13 : Cycles de croissance et divisions de vésicules multilamellaires.

Modèle de croissance et de division cellulaire mis en évidence avec de l'acide oléique. Des micelles viennent nourrir les vésicules en acides oléiques ce qui entraîne leur croissance. Lors de ce phénomène, la vésicule initialement ronde devient allongée. Une étape d'agitation permet la séparation des vésicules allongées en vésicules filles. Chacun des cycles permet alors la formation de nouvelles vésicules, mais 40% du matériel est perdu.

D'autres méthodes permettent d'observer la division de vésicules et sont liées à la présence de peptides (Nomura *et al.*, 2004), de cations multivalents (Tanaka et Yamazaki, 2004), mais aussi de champs électriques (Terasawa *et al.*, 2012). L'absence d'expression de protéines par

l'encapsulation de système cell-free à l'intérieur des vésicules d'acides gras constitue une limite dans les processus de divisions basés sur l'activité d'enzymes.

B/ Les compartiments non-vésiculaires

Des systèmes membranaires artificiels alternatifs basés sur l'auto-assemblage de molécules inorganiques (colloïdosomes), de protéines couplées à des polymères (protéinosomes) ou des polymères (polymèrsomes) ont été développés. Ces compartiments possèdent une membrane perméable qui permet la diffusion des solutés depuis le milieu extérieur. En effet, même si l'auto-assemblage des molécules permet la formation d'une barrière entre le milieu intérieur et le milieu extérieur du compartiment, des pores permettent la diffusion des molécules. Ils constituent un modèle de compartiment permettant potentiellement de dépasser les limites d'encapsulation des vésicules ce qui en fait une alternative intéressante pour l'encapsulation de systèmes d'expression de protéines. Cependant, il est important de noter que ces systèmes ne permettent pas pour l'instant une incorporation sélective des composés du milieu extérieur.

a) Les colloïdosomes

Les colloïdosomes sont des microcapsules formées par l'auto-assemblage spontané d'une particule colloïdale sur une interface eau/huile ou huile/eau (Figure 14). Cet assemblage permet la formation de structures proches de 50 μm et est favorisé par une diminution de l'énergie libre liée à l'association des particules à la surface de l'interface (Dinsmore *et al.*, 2002). Les particules sont ensuite réticulées avant d'être transférées dans une phase aqueuse. Depuis la mise en évidence de ces systèmes, une large palette de colloïdosomes a pu être préparée, basée principalement sur de la silice (Binks et Murakami, 2006), mais aussi sur des particules d'or (He *et al.*, 2012) ainsi que des métaux organiques (Pang *et al.*, 2013).

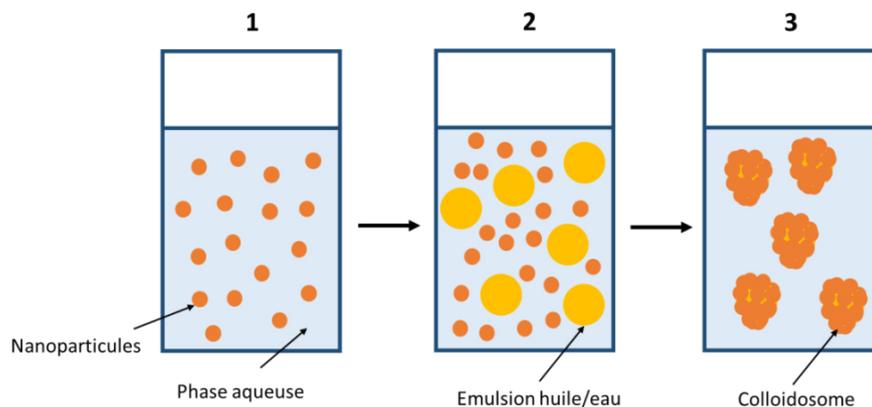


Figure 14 : Représentation d'une méthode de formation de colloïdosomes basée sur une émulsion huile dans eau.

(1) La première étape consiste en la solubilisation dans l'eau des nanoparticules de préalablement solubilisées dans de l'éthanol. (2) Une solution huileuse (cyclohexane) est ensuite ajoutée goutte à goutte dans la solution de nanoparticules. (3) Les nanoparticules s'adsorbent à la surface de l'émulsion.

Un des avantages majeurs de ces systèmes réside dans la capacité de contrôler la largeur des pores constituant la capsule en fonction de la température (Shah *et al.*, 2010) ou du pH (Cayre *et al.*, 2013) permettant ainsi une modulation de l'encapsulation (Rosenberg, 2013). Ces systèmes ont permis de mettre en évidence l'encapsulation de différentes macromolécules afin d'effectuer des réactions enzymatiques, mais aussi l'expression de protéines par encapsulation de systèmes cell-free (Li, 2011). Des études récentes ont montré la possibilité de synthétiser à l'intérieur du colloïdosome des structures mimant un cytosquelette dont la formation est réversible en fonction de la température (Kumar *et al.*, 2013). Cependant, même s'il reste difficile d'envisager comment ces compartiments pourraient se diviser de manière analogue aux cellules, certaines études ont montré qu'une division primitive était possible par rupture de la paroi du colloïdosome mère entraînant une extrusion du volume stabilisé par un apport externe de particules colloïdales (Li *et al.*, 2014).

b) Les protéinosomes

Les protéinosomes sont des compartiments basés sur l'auto-assemblage au niveau d'une interface de protéines et de polymères conjugués (Rawlings *et al.*, 2014). Ces systèmes sont basés sur la réticulation des polymères avec les protéines à l'interface d'émulsions eau/huile. Ces compartiments peuvent être transférés dans l'eau et ainsi délimiter un compartiment d'une taille généralement inférieure à 100 μm et perméable à une grande variété de molécules et de particules de taille inférieure à 40 kDa. De même que pour les colloïdosomes, ces compartiments sont robustes à de grandes variations de pH et de température (70°C) ce qui représente un avantage sérieux, pour l'accomplissement de réactions à hautes températures comme la PCR, comparativement aux vésicules de lipides (Liu *et al.*, 2016). Un autre de ces avantages réside dans la possibilité de moduler la taille des pores en fonction du polymère ainsi que des protéines choisies. La capacité d'encapsulation de ces systèmes a largement été démontré par des approches de fluorescence et a permis de mettre en évidence l'expression de protéines par encapsulation de systèmes cell-free (Huang *et al.*, 2013). La formation d'un réseau semblable à un cytosquelette ainsi que la formation d'une structure autour de la membrane de façon analogue à la paroi cellulaire des bactéries ont été démontré directement par la formation de polymères fluorescents (Huang *et al.*, 2014).

c) Les polymèresomes

Les polymèresomes sont des compartiments basés sur l'auto assemblages de blocs copolymères amphiphiles (Discher et Eisenberg, 2002). L'organisation de ces polymères permet la formation de d'une bicouche semblable à celle des liposomes par interaction hydrophiles et hydrophobes entre les différents blocs des polymères (Zhu *et al.*) (Figure 15).

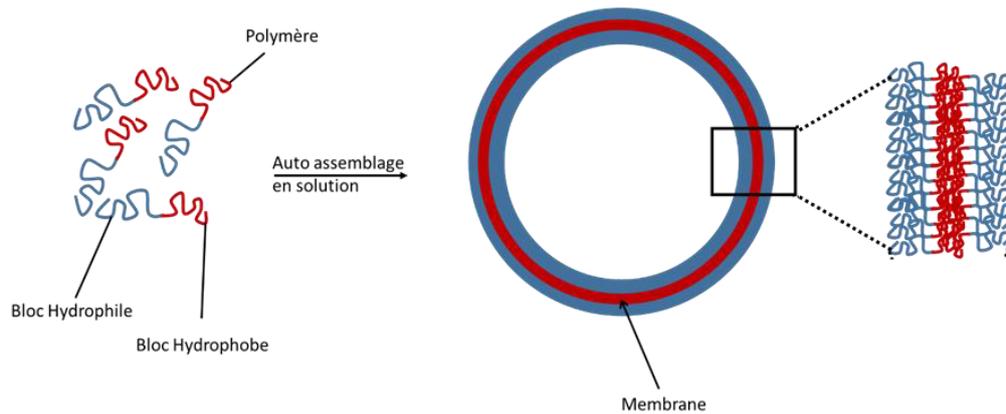


Figure 15 : Polymèresome basé sur l'auto-assemblage de doubles blocs copolymères.

L'auto-assemblage du polymèresome est basé sur des interactions hydrophiles et hydrophobes entre les différents blocs des polymères. Ici sont représentés des polymèresomes basés sur des polymères possédant une partie hydrophile et hydrophobe appelés copolymères. Il existe des polymères possédant deux parties hydrophiles et une partie hydrophobe appelés terpolymères.

Ces systèmes sont plus stables que les liposomes à des gammes de température et de pH importantes. De plus l'ingénierie du polymère utilisé permet de moduler la taille des pores permettant une incorporation de substrats plus sélective (Kim *et al.*, 2009 ; Kumar *et al.*, 2007). Il a été montré que des enzymes pouvaient être séquestrées à l'intérieur permettant l'accomplissement de réactions en chaînes via la diffusion du substrat à travers la membrane semi-perméable du polymèresome (Nardin *et al.*, 2000 ; Vriezema *et al.*, 2007). Dans certains cas, une des protéine de la chaîne de réaction est ancrée à la surface de la membrane (van Dongen *et al.*, 2009). Cependant, malgré le fait que de nombreuses études mettent en évidence des réactions enzymatiques à l'intérieur des compartiments aucune étude visant à exprimer des protéines par des systèmes cell-free n'a encore été mise en évidence. Les principaux travaux dans l'étude des polymèresomes visent à ce jour à mettre en évidence la multi-compartimentation de polymèresomes à l'intérieur de polymèresomes afin de mettre en évidence des cascades de réactions enzymatiques à travers les différents compartiments (Marguet *et al.*, 2013 ; Peters *et al.*, 2014 ; Shum et Weitz, 2011).

L'ensemble des compartiments artificiels présentés montrent des capacités d'encapsulations importantes liées à la diffusion de biomolécules à travers les pores de ces membranes artificielles. Les travaux liés à l'expression de protéines dans ces systèmes montrent qu'ils constituent des compartiments viables pour effectuer des réactions biologiques. Cependant, l'absence de biomimétisme de la membrane pourra constituer une limite dans les processus de divisions du compartiment.

C/ **Les coacervats**

a) *Méthode de formation*

La coacervation est un phénomène de désolvatation associatif de macromolécules, conduisant à une séparation de phases liquide-liquide au sein d'une solution. A l'issue de la coacervation, deux phases sont présentes dans le milieu, le coacervat riche en macromolécules et pauvre en eau ainsi que la phase aqueuse, pauvre en macromolécule et riche en eau (Wang et Wang, 2014). La coacervation peut être simple ou complexe en fonction du mécanisme de séparation de phase (Bungenberg De Jong et Kruyt, 1949). La coacervation simple implique une macromolécule unique : la coacervation est induite par un agent déshydratant (sel, alcools, pH, température) qui promeut l'interaction entre les macromolécules. La coacervation complexe correspond à une séparation de phase basée sur des interactions électrostatiques ou hydrophobes entre deux molécules comme des polymères, des macromolécules et/ou des tensio-actifs. Cette séparation de phase démontrée pour la première fois par Bungenberg de Jong dans les années 1920 entraîne dans la majorité des cas la formation de gouttelettes enrichies en composés (Bungenberg De Jong, 1929) (Figure 16).

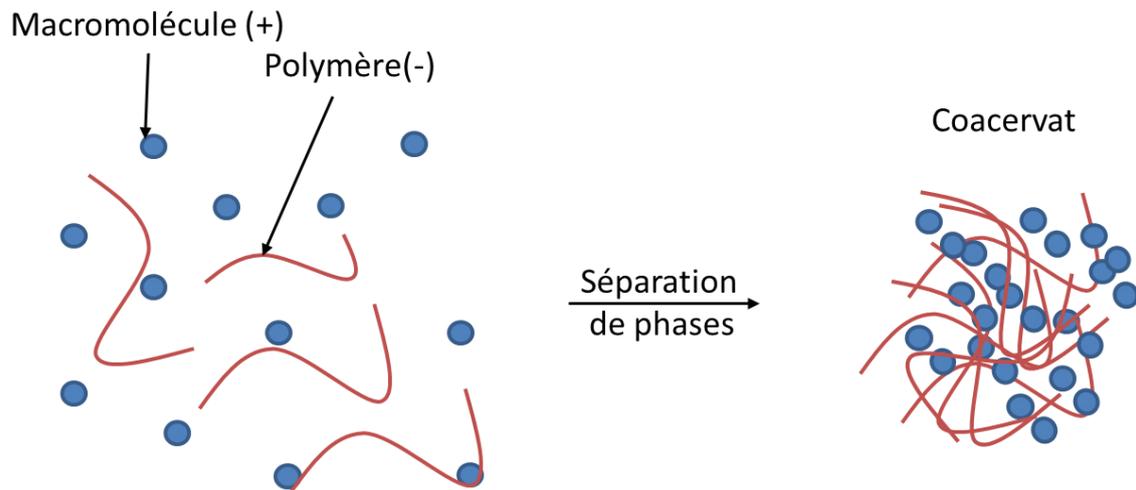


Figure 16 : Phénomène de coacervation complexe.

Cette figure représente un exemple de coacervation complexe basée sur des interactions électrostatiques. La coacervation s'effectue en partie grâce aux interactions électrostatiques mais aussi grâce au gain d'entropie généré par la coacervation.

La formation spontanée de gouttes sans membrane a été popularisée par Oparin qui a décrit très tôt les coacervats comme un modèle viable de protocellules (Oparin, 1938). Plus tard, les coacervats ont capitalisé un intérêt important dans les domaines de traitement des eaux (Kapakoglou *et al.*, 2008), de formulation cosmétique (Kalantar *et al.*, 2007), de purification de protéines (Xu *et al.*, 2011) ainsi que d'encapsulation de principes actifs pharmaceutiques (Deasy et O'Connell, 1984; Kayes, 1977).

La coacervation a été principalement décrite pour deux types de composés dont les applications sont différentes : Les macromolécules et les tensio-actifs. La coacervation de macromolécules est celle décrite par De Jong et Oparin et peut se manifester avec des polymères synthétiques ou des biomolécules (Kizilay *et al.*, 2011 ; Veis, 2011). La coacervation de macromolécules est le plus souvent complexe et se produit par interaction électrostatique entre les deux composés. Ce phénomène de coacervation a été observé entre autres, entre des polymères chargés (Evan Spruijt, 2010), des polymères et des protéines (Obermeyer *et al.*, 2016). Ce type de coacervats est celui qui fait l'objet à l'heure actuelle de nombreuses études pour compartimenter des biomolécules.

La coacervation est décrite aussi pour certains tensio-actifs (Li *et al.*, 2012 ; Mayya *et al.*, 2003). Ce phénomène bien caractérisé chez les tensio-actifs non-ioniques est potentiellement lié à une agrégation des micelles en solution à une température donnée (Manohar, 2003). Ce phénomène de coacervation s'effectue favorablement grâce à l'entropie générée lors de l'interaction entre les micelles couplées au relargage de l'eau associée aux têtes polaires. Dans le cas des tensio-actifs zwitterioniques et ioniques, ce phénomène a été pour l'instant beaucoup moins décrit principalement à cause de la répulsion des charges induite par les tensio-actifs. En ce qui concerne les acides gras, une séparation de phase a été montrée avec de l'oléate de sodium en présence de triéthylammonium chloride (Kalur et Raghavan, 2005) mais n'engendre pas la formation de coacervats (Horbaschek *et al.*, 1998). Cependant, une seule étude fait état de la formation de coacervats basé sur des acides gras (acide oléique) en présence de Tétrabutylammoniumchloride (Ruiz, 2006). A ce jour, aucun coacervat basé sur des acides gras saturés à longues chaînes n'a encore été mis en évidence. La coacervation de surfactants fait aujourd'hui l'objet d'études principalement dans les domaines de la purification de protéines et dans les domaines cosmétologiques et de l'agronomie et ne sont pas appliquées aux études des cellules minimales à l'heure actuelle.

b) Encapsulation de biomolécules

La formation spontanée de coacervats permet la séquestration et la concentration de matériel biologique par diffusion dans des coacervats de d'Oligolysine/ATP (Koga *et al.*, 2011). Le phénomène de concentration par diffusion est décrit comme étant lié à des interactions électrostatiques ou hydrophobes entre le coacervat et le soluté. Ceci permet d'obtenir des concentrations de molécules à l'intérieur des coacervats beaucoup plus importantes que dans les systèmes vésiculaires dans de nombreux cas. Les conséquences de cet effet de concentration ont été observées principalement avec les réactions enzymatiques ou le taux

de catalyse surpasse largement celui obtenu en solution diluée (Koga *et al.*, 2011 ; Strulson *et al.*, 2012). Cependant, même si l'effet de concentration semble très important et prometteur, les études concernant l'expression des protéines restent restreintes. Une seule publication fait mention d'une expression *in vitro* de protéines basée sur la séquestration de systèmes cell-free dans des coacervats de Dextran/Polylysine (Dora Tang TY, 2015).

c) Les systèmes hybrides

Le faible nombre de synthèses complexes mises en évidence dans les coacervats est en partie dû à un problème majeur : les coacervats ont tendance à coalescer au cours du temps ce qui pose un problème de compartimentation incompatible avec l'élaboration d'une cellule minimale. De plus, ils ne présentent pas les propriétés biomimétiques et d'encapsulation stricte des vésicules. C'est pourquoi, des systèmes hybrides ont été mis en évidence. Ces systèmes sont basés sur la formation de coacervats à la surface desquels une membrane (organique ou non) est assemblée (Figure 17). Le premier système hybride mis en évidence est basé sur un coacervat d'Oligolysine/ATP à la surface duquel sont assemblés des acides gras sous forme de plusieurs bicouches (Dora Tang *et al.*, 2014).



Figure 17 : Elaboration d'un système de transition hybride.

Le coacervat est formé en solution, puis une solution d'acide gras est ajoutée permettant l'assemblage autour du coacervat de plusieurs bicouches. L'intérieur du système peut ensuite être délité par des changements de forces ioniques ou de pH.

Des changements de force ionique ou de pH permettent alors de désassembler le coacervat tout en conservant l'intégrité de la membrane. Ces expériences mettent alors en évidence pour la première fois un système transitoire basé sur les propriétés de séquestration du coacervat et d'encapsulation des bicouches d'acide gras. En parallèle, d'autres travaux ont

montré que des coacervats de PEG/Dextran pouvaient être stabilisés par des vésicules de lipides à la surface du coacervat constituant un autre modèle de compartiment hybride (Dewey *et al.*, 2014).

3) Les bactéries de la classe des mollicutes comme cellules minimales du vivant.

A/ Présentation

Il existe dans la nature des organismes dont la structure est des plus simples : Les mollicutes. Ce sont les procaryotes les plus petits capables de se répliquer de manière autonome (Razin, 1992). Ces bactéries sont caractérisées par un génome minimal (0.5 à 2.2 kpb) qui ne permet pas l'accomplissement de nombreuses voies de biosynthèse comme celle de la paroi ou des lipides. Ils sont constitués d'une membrane de phospholipides qui représente pour la majorité des espèces la seule interface avec le milieu extérieur à la manière des vésicules. Afin de se maintenir et de croître, les mollicutes ont besoin d'un apport exogène de lipides présents dans leur environnement (Tully, 1993).

Au cours de l'évolution, ces bactéries présentes chez l'Homme, les plantes et les animaux ont évolué de manière régressive à partir d'un ancêtre bactérien à Gram-positif (Woese, 1987). Cette évolution est liée à une réduction de la taille du génome avec la perte massive de gènes non essentiels à l'auto-réplication. Ceci représente un des intérêts majeurs des mollicutes dans la construction de cellules minimales dans la mesure où les gènes issus de ce processus évolutif constituent un set potentiel de gènes minimal. Par conséquent, les mollicutes possèdent un nombre limité de voies métaboliques (principalement le glucose et l'arginine pour le métabolisme du carbone) ce qui nécessite un comportement parasitaire : l'hôte infecté leur fournit les métabolites indispensables à leur survie et leur réplification. L'ensemble

des fonctions de ces bactéries est réduit à leur forme la plus essentielle dans la mesure où chaque partie du génome a été « optimisée ».

B/ **Transplantation de génomes**

Les outils génétiques comme la recombinaison homologue, utilisés en routine chez d'autres bactéries pour générer des mutants ne sont pas applicables pour de nombreuses espèces, impliquée dans ce processus. De plus certains processus comme la transformation ne sont pas applicables à de nombreux mollicutes. Ainsi, de nouvelles technologies ont émergé afin de pallier les limites expérimentales dues aux mollicutes. Ces expériences ont pour objectif de purifier le génome de mollicutes et de le transformer dans la levure. Cette dernière possède un système très efficace de recombinaison homologue et permet de modifier de grandes portions de génomes (Figure 18) par des approches classiques ou grâce à des technologies récentes comme CRISPR/cas9 (Tsarmopoulos *et al.*, 2016) non applicable directement chez les mollicutes. Une fois modifié dans la levure, le génome est extrait, puis transplanté dans une bactérie mollicute dite « receveuse » qui va alors adopter le phénotype du génome transplanté. L'intérêt de cette méthode dans l'élaboration de cellules minimales réside dans le fait de pouvoir extraire un génome entier de bactérie en vue de l'encapsuler dans un compartiment. Dans le cas des expériences effectuées chez les mollicutes, le génome est transplanté dans une bactérie « receveuse » qui fait alors office de compartiment. En ce qui concerne l'élaboration de cellules minimales, l'accession à un génome entier pourrait permettre à plus long terme d'effectuer de l'expression multigénique plus complexe dans des compartiments. Cependant, il n'existe pour le moment aucun système analogue aux systèmes cell-free issus d'*E.coli* pour permettre l'expression de protéines de mollicutes ce qui limite encore à l'heure actuelle l'utilisation de génomes de mollicutes pour la production de cellules minimales.

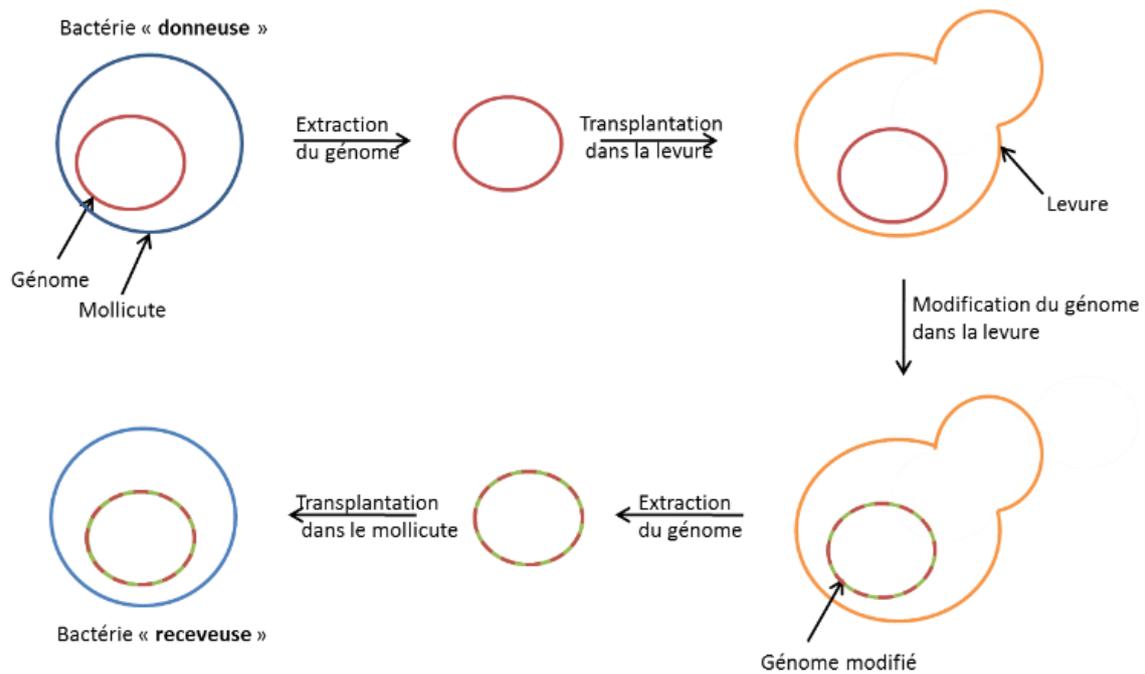


Figure 18 : Transplantation de génomes de mollicutes.

Le génome de la bactérie mollicute est extrait puis transplanté dans la levure. Le génome possède une origine de réplication dans la levure ainsi qu'un marqueur de sélection. En parallèle, les morceaux d'ADN nécessaires à la recombinaison dans la levure sont aussi transformés. La levure modifie le génome transplanté par recombinaison homologue. Ce génome modifié est ensuite extrait pour être ensuite transplanté dans la bactérie receveuse. Cette bactérie receveuse est ensuite sélectionnée sur milieu contenant un antibiotique pour permettre la sélection des clones ayant intégré le génome donneur. Si le génome est transplanté, la bactérie receveuse va acquérir le phénotype de la bactérie donneuse.

Les mollicutes constituent un système bactérien intéressant dont le fonctionnement simple se rapproche le plus de la cellule minimale. Fondamentalement, la compréhension du fonctionnement des mollicutes pourrait nous aider à comprendre les mécanismes indispensables du vivant. Les outils développés sur ces bactéries (extraction de génomes) couplés à une organisation simple en font un modèle de choix pour les approches qui visent à reconstruire expérimentalement des cellules par l'approche constructionniste.

4) Extraction de protéines de bactéries dans des compartiments

La compartimentation de bactéries entières a toujours suscité un intérêt important dans de nombreux domaines comme la bioproduction (Bric *et al.*, 1991), les biosenseurs (D'Souza, 2001; Paddle, 1996), le « screening » (Sundberg, 2000) ou la délivrance de principes actifs pharmaceutiques. Les nouvelles technologies comme la microfluidique permettent de développer des approches de caractérisation sur cellules uniques à l'intérieur d'émulsions (Delincé *et al.*, 2016). L'objectif est de séquestrer les bactéries à l'intérieur d'un compartiment soit pour effectuer de la bioproduction ou du « screening » de cellules (Baret *et al.*, 2009) (Beneyton *et al.*, 2014), soit pour en extraire l'ensemble des composants au sein du compartiment (Figure 19). Les bactéries sont dans la plupart des cas directement séquestrées dans les compartiments avant d'être lysées pour relarguer le contenu cytosolique. Dans certains cas les bactéries sont d'abord lysées afin que le contenu soit ensuite séquestré dans le compartiment. Cette pratique est cependant moins répandue dans la mesure où la compartimentation des produits relargués peut être limitante.

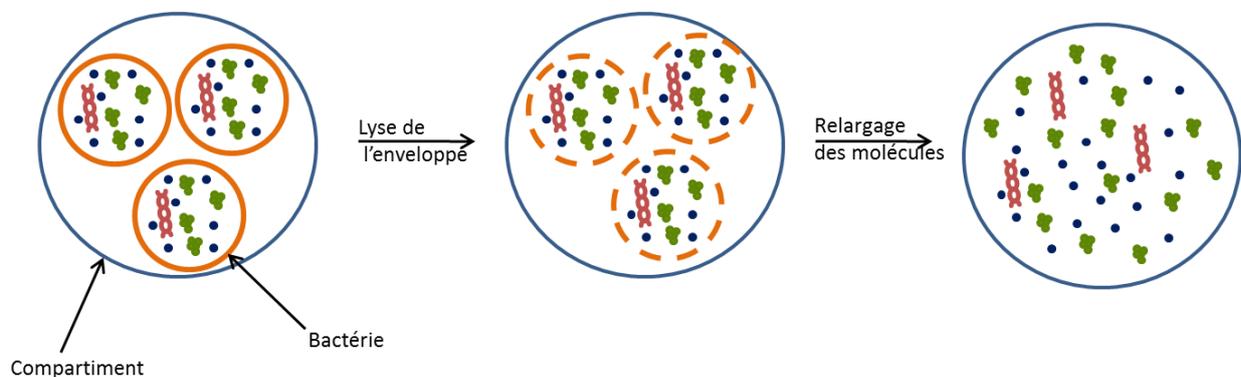


Figure 19 : Extraction de protéines de bactéries dans des compartiments.

Les bactéries sont séquestrées dans un compartiment. La présence de produit permettant la lyse de la paroi et des membranes entraîne le relargage de tous les composés présents dans le cytosol à l'intérieur du compartiment. Des réactions peuvent ainsi être effectuées à l'intérieur du compartiment.

L'intérêt d'utiliser des bactéries entières ou lysées réside dans le fait que (i) les protéines sont déjà contenues dans les bactéries ce qui limite les processus de purification, (ii) les enzymes

sont déjà concentrées à l'intérieur du système bactérien. Ainsi la concentration en bactéries associée à la quantité de molécules à l'intérieur des bactéries amplifie l'effet de concentration à l'intérieur des compartiments. Ces applications servent à l'heure actuelle principalement dans la production enzymatique de composés d'intérêt à travers la reconstitution de voies métaboliques issues des bactéries à l'intérieur des compartiments (Heo *et al.*, 2003).

Objectif des travaux.

L'ensemble des données présentées dans la littérature laisse apparaître plusieurs points importants. La viabilité d'un compartiment pour mimer le comportement d'une cellule s'appuie sur sa capacité à encapsuler de grandes quantités de biomolécules, et de posséder certaines caractéristiques propres au vivant comme la présence de membrane et la capacité à se diviser. Sur l'ensemble de ces points, les différents compartiments présentés dans l'introduction présentent chacun des limites.

- L'encapsulation de grandes quantités de matériel dans les systèmes vésiculaires par les méthodes d'hydratation de film lipidique demeure faible.
- La production de vésicules par les méthodes de transfert d'émulsions contenant de grandes quantités de matériel est limitée.
- La coacervation ainsi que les compartiments artificiels sont capable d'encapsuler beaucoup de matériel (>70%) mais ne possèdent pas de membranes semblables à celle du vivant.

À la vue de chacune de ces limites, il est évident que le système idéal n'existe pas. Ainsi, l'élaboration d'un système pouvant bénéficier des taux d'encapsulation importants des coacervats et des propriétés biomimétiques des vésicules pourrait dépasser les limites de chacun des compartiments pris séparément.

Objectif de la thèse :

- Elaborer un compartiment basé sur l'utilisation des acides gras permettant de séquestrer de grandes quantités de molécules afin d'effectuer des réactions enzymatiques.

Ce système devra pallier les défauts de toutes les méthodes utilisées à ce jour. Il devra posséder les capacités de séquestration des coacervats tout en conservant les propriétés d'encapsulation des vésicules. Afin d'augmenter les chances d'encapsuler toutes les enzymes nécessaires à l'accomplissement de réactions complexes, ce système devra être capable de produire de très grandes quantités de vésicules et ainsi pallier les défauts des systèmes de transferts d'émulsions.

Pour cela nous imaginons un système de transition coacervats à vésicules.

Dans un premier temps, ce système pourra adopter la structure des coacervats. Ce système qualifié d' « ouvert » devra séquestrer une grande quantité de biomolécules. Dans un second temps le coacervat pourra effectuer une transition en vésicules. Ce système qualifié de « fermé » permettra l'encapsulation stricte des biomolécules séquestrées initialement dans les coacervats. (Figure 20). De plus, dans le but de construire une cellule minimale, ce système devra être biocompatible, c'est-à-dire fonctionner dans des gammes de température et de pH compatibles avec le vivant.

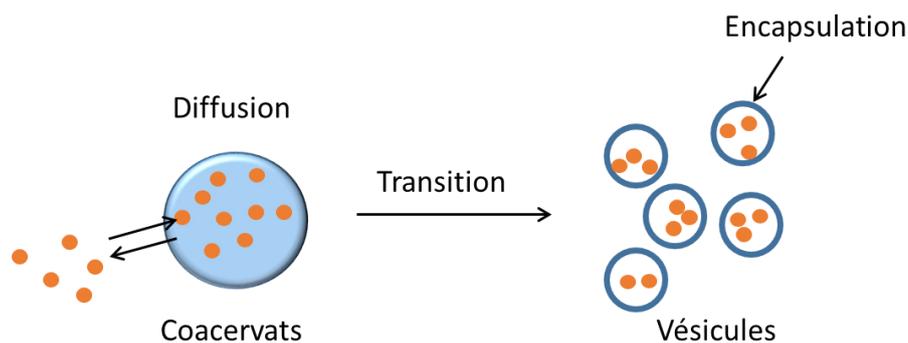


Figure 20 : Système de transition coacervat-vésicules.

L'objectif de ce travail de thèse est de mettre en évidence un système hybride basé sur la formation d'un coacervat capable à son tour de former des vésicules pour encapsuler des grandes quantités de protéines.

Au laboratoire, nous travaillons sur les structures adoptées par les acides gras saturés à longues chaînes (C:14, C:16) en présence de guanidine. L'intérêt des acides gras à longues chaînes pour notre projet réside dans le fait qu'ils constituent un élément structural important des membranes ce qui fait des acides gras un excellent modèle biomimétique pour l'élaboration d'un compartiment. De plus, les acides gras sont des molécules qui présentent un très grand polymorphisme en solution ce qui est d'un intérêt majeur pour les systèmes de transitions que nous voulons mettre en place. Pour finir, les acides gras constituent un composant potentiel du compartiment des protocellules de par leur simplicité structurale, leur présence possible dans la soupe pré-biotique^{70, 71}.

Pour ce projet de thèse, nous nous sommes donc intéressés à ce système d'acides gras saturés à longues chaînes/Guanidine pour former un système de transition. Ce système est capable de former à la fois des micelles allongées ainsi que des vésicules. Cependant aucune séparation de phase à la manière des coacervats n'a encore été montrée.

L'objectif du premier projet est de déterminer si les micelles allongées peuvent former des coacervats par séparation de phase à température ambiante et à un pH compatible avec le vivant. Nous avons montré que la présence d'un excès de guanidine entraîne un phénomène de trouble en solution. Au microscope nous avons observé la formation de gouttes hétérogènes capable de coalescer. Nous avons déterminé par des méthodes de caractérisations physico-chimiques (RMN, Diffusion de neutrons) que la structure des coacervats était basée sur un assemblage de micelles. A plus basse température, les acides gras forment des bicouches. En parallèle nous avons montré que les coacervats sont capables de séquestrer des sondes moléculaires en fonction de la charge et de l'hydrophobicité. Ces expériences nous donnent des informations sur la séquestration potentielle des biomolécules (protéines, ADN) à l'intérieur des coacervats (Figure 21).

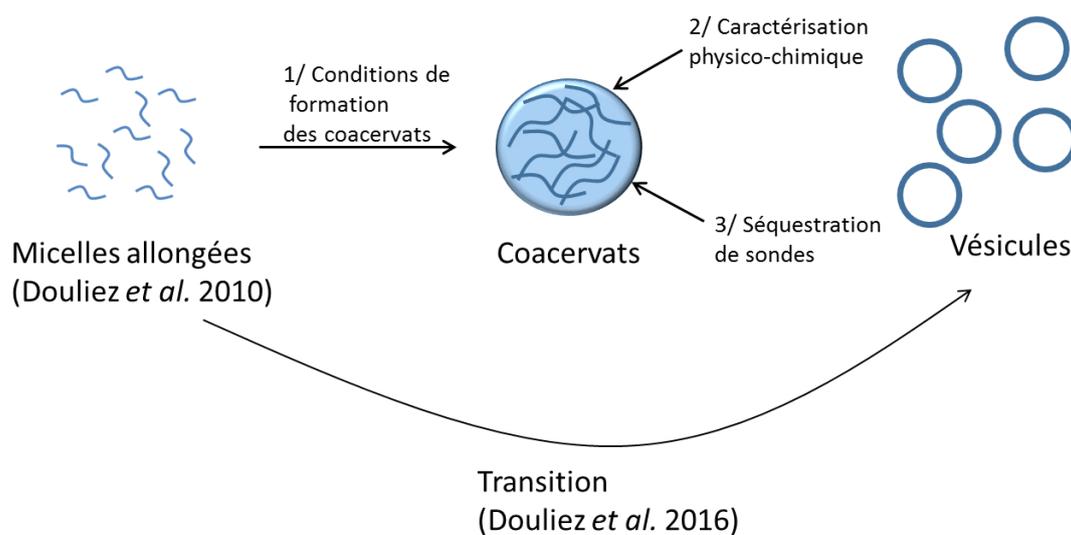


Figure 21 : [Résumé des objectifs du premier projet.](#)

Le second projet consiste à mettre en place la transition de coacervats à vésicules. Nous avons montré qu'une transition des coacervats en vésicules est possible par diminution de pH ou d'ajout d'alcanols. Nous avons quantifié ensuite la séquestration de différentes protéines à l'intérieur des coacervats par des méthodes de mesures UV-visibles ou fluorescence et déterminé que les protéines étaient séquestrées majoritairement dans les coacervats (>70%).

En effectuant la transition, nous avons montré que le matériel séquestré dans les coacervats était retrouvé dans les vésicules. En quantifiant l'encapsulation, nous avons montré qu'environ 50% des molécules séquestrées étaient encapsulées dans les vésicules. Nous avons ensuite mis en évidence des réactions enzymatiques via l'encapsulation de tous les partenaires à l'intérieur des vésicules (Figure 22).

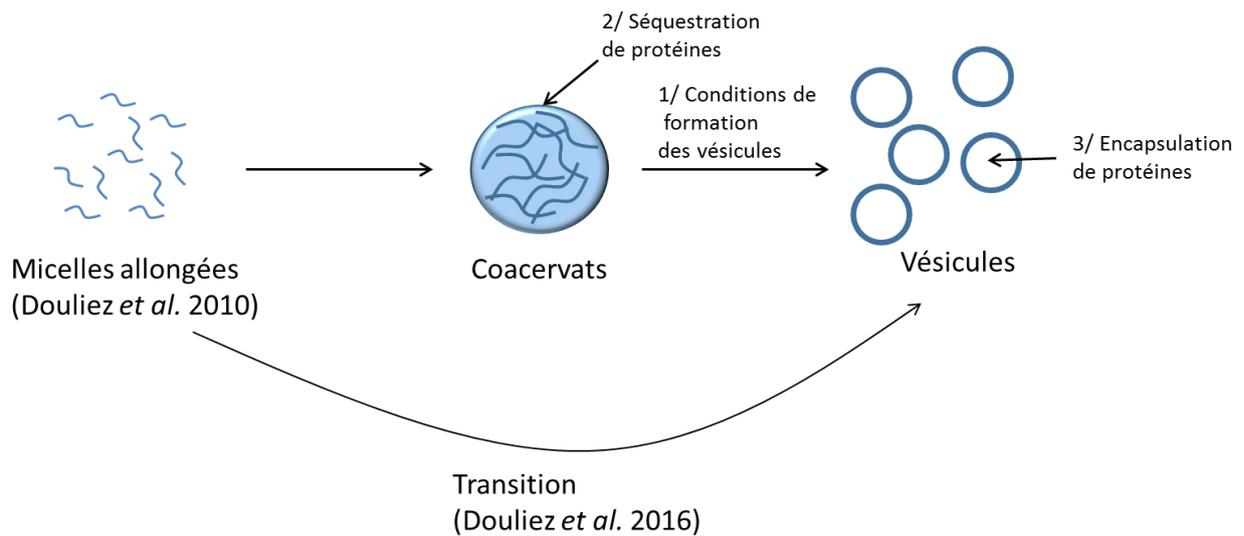


Figure 22 : Résumé des objectifs du second projet

Le troisième projet consiste à effectuer des réactions métaboliques à partir de protéines de mollicutes. Nous avons observé que les coacervats étaient capables d'extraire une très grande partie des protéines des mollicutes. Ceci permet la formation de vésicules contenant les protéines de mollicutes. Nous avons ainsi mis en évidence l'activité de la Lactate déshydrogénase de mollicutes en présence de vésicules par le suivi de formation du NAD au cours du temps. Cependant, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence des réactions métaboliques comme la glycolyse en suivant la formation de NAD ou en utilisant des méthodes de fluorescence (Figure 23).

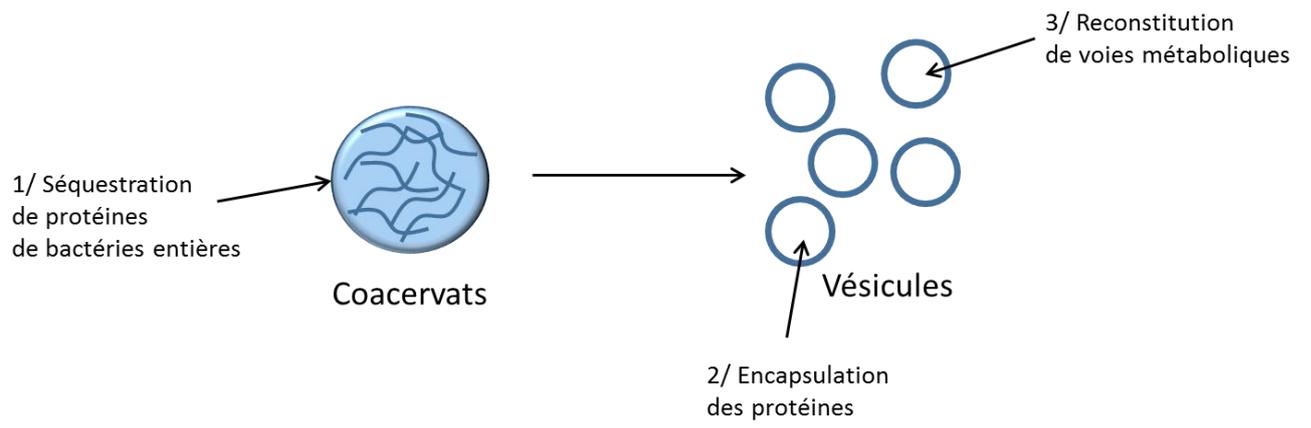


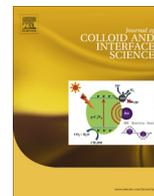
Figure 23 : [Résumé des objectifs du troisième projet](#)

Chapitre 1

Caractérisation du système de trouble chez les acides gras

1) Publication

Les résultats obtenus pour ce premier chapitre de thèse ont été publiés dans *Journal of colloid et interface science* sous le titre « Clouding in fatty acids dispersion for charge-dependant dyes extraction »



Clouding in fatty acid dispersions for charge-dependent dye extraction



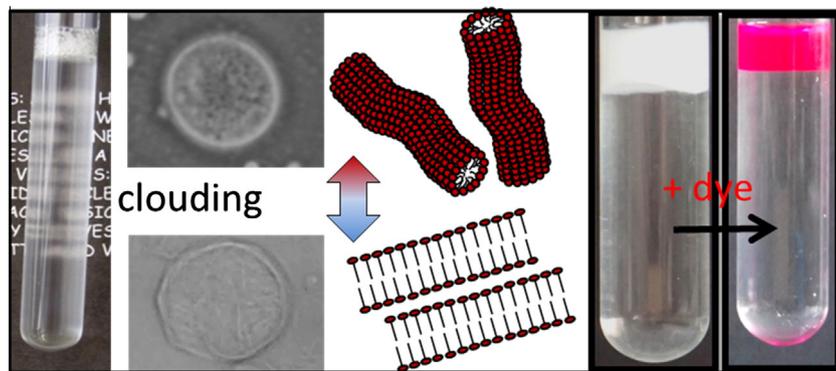
David Garenne^a, Laurence Navailles^b, Frédéric Nallet^b, Axelle Grélard^c, Erick J. Dufourc^c, Jean-Paul Douliez^{a,*}

^a UMR 1332, biologie et pathologie du fruit, INRA, centre de Bordeaux, 33883 Villenave d'Ornon, France

^b Université de Bordeaux, Centre de Recherche Paul-Pascal, CNRS, Av. A. Schweitzer, 33600 Pessac, France

^c Institute of Chemistry and Biology of Membranes and Nano-objects, UMR 5248, CNRS, Université de Bordeaux, Institut Polytechnique Bordeaux, F-33600 Pessac, France

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2015

Revised 21 January 2016

Accepted 22 January 2016

Available online 23 January 2016

Keywords:

Surfactant clouding

Fatty acid

Self-assembly

Compartments

Dye sequestration

ABSTRACT

The clouding phenomenon in non-ionic surfactant systems is a common feature that remains rare for ionic detergents. Here, we show that fatty acid (negatively charged) systems cloud upon cooling hot dispersions depending on the concentration or when adding excess guanidine hydrochloride. The clouding of these solutions yields the formation of enriched fatty acid droplets in which they exhibit a polymorphism that depends on the temperature: upon cooling, elongated wormlike micelles transit to rigid stacked bilayers inside droplets. Above this transition temperature, droplets coalesce yielding a phase separation between a fatty acid-rich phase and water, allowing extraction of dyes depending on their charge and lipophilicity. Positively charged and zwitterionic dyes were sequestered within the droplets (and then in the fatty acid-rich upper phase) whereas the negatively charged ones were found in both phases. Our results show an additional case of negatively charged surfactant which exhibit clouding phenomenon and suggest that these systems could be used for extracting solutes depending on their charge and lipophilicity.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The clouding phenomenon in aqueous micellar solutions of non-ionic surfactants is a common feature [1,2]. It is characterized

by a change in the sample turbidity that generally occurs upon heating. The initial clear surfactant solution made of micelles becomes cloudy at a temperature called the cloud point. There exist numerous references on the theory of the clouding phenomenon, one of these suggest that clouding originates from attractive interactions between micelles [3], leading to a liquid-liquid phase separation [4]. This is the reason why it mainly occurs

* Corresponding author.

E-mail address: jean-paul.douliez@bordeaux.inra.fr (J.-P. Douliez).

in non-ionic surfactant systems and would typically not happen for ionic ones because of dominating electrostatic repulsions between micelles. However, in some cases, when these repulsions can be screened out by increasing for instance the ionic strength or by using bulky counter-ions, the clouding may also occur in ionic surfactant systems [5–11]. The clouding phenomena have been mainly studied in the literature in the case of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and sodium dodecylsulfate (SDS). Recently, this has also been observed in sodium oleate (an unsaturated fatty acid, C_{18:1}) dispersions upon addition of triethylammonium chloride [7]. However, clouding in saturated long chain fatty acid (sLCFA, namely myristic acid: C_{14:0}, palmitic acid: C_{16:0} and stearic acid: C_{18:0}) systems has never been reported [12]. sLCFA are of particular interest compared to synthetic surfactants mainly because they are greener, bioavailable in large amounts, biodegradable and exist under various forms: with different chain lengths, possibly bearing double bonds and/or hydroxyl groups along the chain that may trigger the self-assembly [12,13]. sLCFA are also widely used in cationic systems, in combination with a cationic surfactant [14–17]. Aqueous dispersions of ‘pure’ sLCFA have been studied for decades [18], in the soap form (sodium or potassium), they self-assemble into micelles at high temperature but crystallize upon cooling below their Krafft point [19–21]. Recently, other soaps were produced in water using tetrabutyl ammonium [22,23] or choline [24–26] counter-ions instead of sodium or potassium. The strong advantage here is that these dispersions no longer crystallized. These counter-ions allowed decreasing the Krafft point of sLCFA yielding stable aqueous micellar dispersions even when samples are kept at 4 °C. However, there is no report on clouding phenomenon in these above mentioned systems. These systems are similar to cationic systems [12,14] except that the positively charged moiety is a soluble counter-ion. Latter, guanidine hydrochloride (GuHCl) has been shown to prevent the crystallization of sodium salts of sLCFA [27,28]. Equimolar mixtures of GuHCl and sodium soaps of sLCFA formed micelles at high temperature and stacked bilayers that no longer crystallized at lower temperature. It has been proposed that the guanidine moiety strongly interacts with the carboxylate group of the sLCFA, probably via electrostatic and bidentate interactions [13,29–31], thus preventing re-protonation of the sLCFA carboxylate ion and then, crystallization [21]. Only ‘low’ sLCFA concentration (=10 mg/mL) and equimolar ratios (sLCFA sodium salts vs. GuHCl) had been investigated in our previous works [27,28] and no clouding had been observed in these experimental conditions.

We are still investigating these fatty acid systems (sLCFA/NaOH/GuHCl), varying the concentration and the ratio of each component and we observed that some samples clouded. We report herein these findings, showing that excess of GuHCl or sufficiently high sLCFA concentration lead to cloudy systems upon cooling hot dispersions, yielding the formation of sLCFA-rich droplets. The sLCFA within these droplets are shown to exhibit a transition upon cooling from elongated wormlike micelles to rigid stacked bilayers. We further study the sequestration of about 30 dyes in these sLCFA droplets and observed that it depends on their charge and lipophilicity.

2. Materials and methods

Protonated (Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) or deuterated (Eurisotop, Saclay, France) fatty acids (myristic acid: C_{14:0}, palmitic acid: C_{16:0} and stearic acid: C_{18:0}) were massed in a tube and ultra-pure water was added in amounts depending on the desired concentration. Then, the desired volume of a 1 M stock solution of guanidine hydrochloride (GuHCl, Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France, ref: G4505) and NaOH were added. All

samples were submitted to at least 3 cycles of freeze thawing and further kept at –20 °C. Prior to being used, each sample was heated at 80 °C for 10 min. For samples for which GuHCl is in excess, the additional volume in excess was poured and sample tubes were again submitted to the above-mentioned procedure for homogenization. Dyes were dispersed in distilled water at a concentration of 2 mg/mL and typically, 100 µL of that stock solution were added to a 5 mL sample of sLCFA (10 mg/mL) droplets. Nile red (Sigma–Aldrich) was used at a concentration of 1 mg/mL in chloroform and 10 µL were added to a 5 mL dispersion of droplets at 10 mg/mL sLCFA.

2.1. Solid state NMR

For NMR experiments, perdeuterated sLCFA (Eurisotop, Saclay, France) was used and samples were prepared in the same way as previously mentioned except that only 1 mL was produced. Samples were placed into a 100 µL ZrO₂ rotor (Cortecnet, Paris, France). Deuterium NMR experiments were carried out in the static mode at 76.8 MHz for deuterium on a Bruker Avance II 500 WB spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) with a CP-MAS dual 4 mm ¹H/²H probe. Quadrupolar-echo sequences [32] were performed to record time-dependent signals that were Fourier transformed with 100–200 Hz Lorentzian filtering to yield wide line spectra. Pulse durations and echo time delay were respectively 2.75 µs and 40 µs, spectral window was 500 kHz and 4 k acquisitions were accumulated with a repetition time of 1.5 s. Temperature was controlled to ±1 °C.

2.2. Microscopy

Observations were made at room temperature at 20× magnification using an optical microscope in the phase contrast mode (Nikon Eclipse E-400, Tokyo, Japan) equipped with a 3-CCD JVC camera allowing digital images (768 × 512 pixels) to be collected. A drop of the lipid dispersion (about 20 µL) was deposited on the glass slide surface (76 × 26 × 1.1 mm, RS France) and covered with a cover slide (22 × 22 mm, Menzel-Glaser, Germany). The glass slides were previously cleaned with ethanol and dried.

Epifluorescence images were acquired (at 20× magnification) with a Nikon Eclipse 800 microscope equipped with a Coolsnap HQ2 digital camera (Photometrics) using the Metavue 7.7.1 software (Roper Scientific, France).

2.3. UV-visible experimental procedure

Spectra were recorded on a Cary (Varian) UV-visible spectrophotometer at 25 °C with samples prepared as described above. In the case of basic fuchsin, toluidine blue, rhodamine 6G, brilliant blue R and rhodamin B, 100 µL of the upper phase was diluted in 1 mL of pure water. The lower phase was taken using a Pasteur pipette to prevent any contamination by the upper phase and used without further dilution. In the case of calcein, bromophenol blue, xylene cyanol and bromocresol purple, 500 µL of both phases were poured in a different sample tube and diluted with 1 mL ethanol.

2.4. Small-angle neutron scattering (SANS)

Small-angle neutron scattering (SANS) experiments were performed at Laboratoire Léon-Brillouin (laboratoire mixte CEA/CNRS, Saclay, France) on the spectrometer PACE. The neutron wavelength was set to 5 or 13 Å with a mechanical velocity selector, the detector being positioned at 1, 3 or 5 m, respectively. The scattering wave vector, *Q*, then ranges from typically 0.003 to 0.5 Å⁻¹, with a significant overlap between the three configurations. The samples, prepared with deuterated water, were held in flat quartz cells

with a 2 mm optical path, and temperature-controlled by a circulating fluid to within ± 0.2 °C. The spectra were corrected for solvent, cell and incoherent scattering, as well as for background noise.

The general theory for fitting the SANS data can be found in the literature [33]. Briefly, the scattered intensity can be described as the product of a *structure factor* $S(Q)$, characteristic of the correlations between objects, by a *form factor* $P(Q)$, describing the shape of the objects. The main equations, here to be used for lipids embedded in either interacting micelles (cylindrical or spherical) or stacked flat membranes, are recalled hereafter. The form factor of a completely filled, spherical object of radius R (a model appropriate for spherical micelles) is given by:

$$P_{sph}(Q) = 9 \cdot \left[\frac{\sin QR - QR \cos QR}{(QR)^3} \right]^2$$

The form factor of a randomly-oriented cylinder with a circular basis of radius R and a virtually infinite height (an elongated rod, a model appropriate for worm-like micelles) is given by:

$$P_{rod}(Q) \propto \frac{1}{Q} \left(\frac{J_1(QR)}{Q} \right)^2$$

where J_1 is the Bessel function of integer order 1.

In the case of a single cylinder of height δ , virtually infinite basis and no preferred orientation (i.e. a randomly-oriented flat platelet, a model appropriate for describing independent bilayers) the form factor becomes:

$$P_{platelet}(Q) \propto \sin^2 \left(\frac{Q\delta/2}{Q} \right)$$

3. Results and discussions

3.1. The clouding phenomenon and the sLCFA-rich droplet formation

As commented above, equimolar mixtures of sLCFA (10 mg/mL), NaOH and GuHCl have already been studied [27,28] but no clouding had been observed in these experimental conditions. Here, we partially investigated the phase diagrams of these systems, varying the sLCFA concentrations and the ratio of GuHCl vs. that of sLCFA and observed that several samples became cloudy upon cooling hot dispersions.

The clouding occurred for the three sodium salts of sLCFAs, myristic acid (My), palmitic acid (Pa) and stearic acid (St) either at 'higher' concentration compared to that used in our previous reports [27,28] or at 10 mg/mL sLCFA but in excess GuHCl, in both cases upon cooling hot dispersions (see sample tube photo, Fig. 1). The partial ternary phase diagrams for the three sLCFA were investigated and are reported Fig. 1 and commented here-after. Obviously, the clouding phenomenon depended on the fatty acid chain length. For myristic acid without excess of GuHCl (green¹ line, Fig. 1a), it occurred above a fatty acid concentration of 40 mg/mL (dot A, Fig. 1a). In the same way, cloudy dispersions were obtained at 10 mg/mL (Fig. 1a) above a molar ratio GuHCl/My of 1.4 (dot B, red line, Fig. 1a). In both cases, clouding was observed upon cooling samples below 45 °C without noticeable variation with the My concentration and the molar ratio GuHCl/My. As shown Fig. 1b and c, for palmitic and stearic acids respectively, the clouding of dispersions prepared at an *equimolar* ratio between sLCFA, NaOH and GuHCl was observed, above concentrations of 30 mg/mL (below 55 °C) and 15 mg/mL (below 80 °C). For more *diluted* systems

(10 mg/mL sLCFA) but upon addition of GuHCl in excess, this occurred above a molar ratio of 1.3 and 1.2, for palmitic and stearic acids, respectively).

As for the gas–liquid phase separation in molecular fluids, the clouding in these systems plausibly occurs due of attractive interactions between fatty acid elongated micelles that become able to overcome the entropic effect favoring homogeneously dispersed states, triggered by the increase in micelle concentration as has been already described in other ionic surfactant systems [3,7]. At this level, we cannot go further in the interpretation of these results and the theoretical reasons for which clouding occurs. Indeed, both Na⁺ and the guanidium moiety can bind the carboxylate group of sLCFA but neither the ratio between Na⁺ and the guanidium moiety at the micellar interface nor in solution have been established. One can only suggest a model as has been done in the case of the clouding phenomenon in the sodium oleate/triethylamine chloride system (see Fig. 9, Ref. [7]): two amine groups of the guanidium moiety could interact with the sLCFA via electrostatic and bidentate interactions whereas the third dangling amine group of the guanidium would be free to make attractive hydrogen bonds with adjacent micelles.

The clouding in these systems resulted in the formation of sLCFA rich droplets that were clearly observed by microscopy (Fig. 2A). Droplets were also doped with a fluorescent lipophilic marker, Nile red allowing observations by epifluorescence microscopy (Fig. 2B). Images revealed the presence of colored droplets showing that they are enriched in sLCFA in which the lipophilic dye was inserted. Microscopy images indicated that the sLCFA droplets were typically in the range of 1–50 μ m in diameter and exhibited a *smooth* internal structure and no birefringence. Below a transition temperature that specifically depended on the sLCFA chain length, droplets exhibited a less spherical shape (Fig. 2C and D) and had an internal *rough* aspect with birefringence (Fig. 2E), suggesting the formation of bilayers at low temperature as shown below. This smooth to rough transition upon cooling occurred at 21, 33 and 50 °C for myristic, palmitic and stearic systems, respectively. This behavior as a function of the temperature is very similar to that observed for stock solutions where no clouding occurs suggesting a similar polymorphism, i.e., elongated micelles at high temperature and flat bilayers below the transition within the droplets.

3.2. Coalescence and phase separation

Upon letting samples rest about 1 h above the smooth to rough transition, coalescence of droplets occurred and this yielded a macroscopic liquid–liquid phase separation (Fig. 3A). In the presence of the lipophilic fluorescent and colored dye Nile red, the upper phase became pinky-red. Because Nile red has a strong affinity for lipids, this shows that the upper phase is much enriched in sLCFA. Upon cooling such samples below the smooth to rough transition temperature, the upper phase became very turbid and milky (Fig. 3B), consistent with the formation of bilayers at that temperature as is further demonstrated. It is noteworthy that the upper phase at such a low temperature, being quite viscous, can be easily recovered by using a spatula (Fig. 3C and D). This feature can be of particular interest for extracting chemicals as is further suggested. Compared to Triton X114 that forms an enriched *lower* surfactant phase, here, sLCFA phase separates in the *upper* phase. This is obviously because sLCFA exhibit a lower density than water.

We also noticed that the volume of the upper phase varied with the amount of GuHCl added in excess (Fig. 3E). For instance, in the case of the myristic acid system (10 mg/mL, My), clouding at a molar ratio of 1/1.5 (sLCFA/NaOH/GuHCl, thus with a moderate excess of GuHCl), yielded a volume of the upper phase of about 3/5 of the total sample volume. For a higher excess of GuHCl (molar

¹ For interpretation of color in Fig. 1, the reader is referred to the web version of this article.

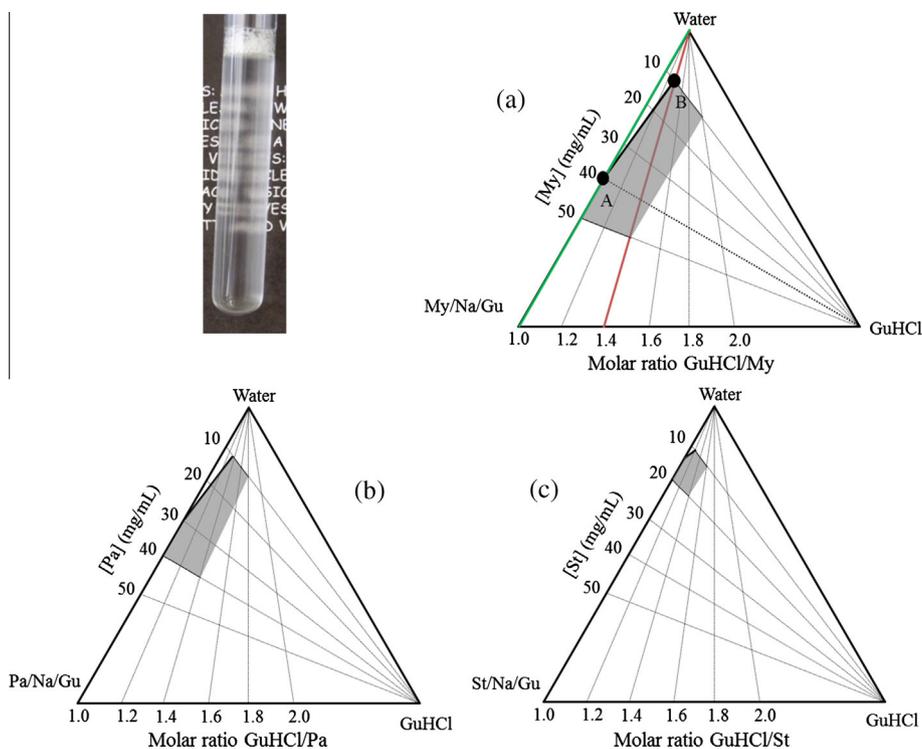


Fig. 1. The clouding phenomenon in sLCFA systems. The sample tube photograph (top-left) shows the clouding phenomenon in the system MyNaGu, (myristic acid, NaOH, GuHCl molar ratio 1/1/2, 10 mg/mL My) at 25 °C. Partial ternary phase diagrams are shown for the three sLCFA systems at 25, 40 and 50 °C for My (myristic acid), Pa (palmitic acid) and St (stearic acid), respectively. The gray zone indicates the samples which were investigated and in which clouding was observed. (See text for other details).

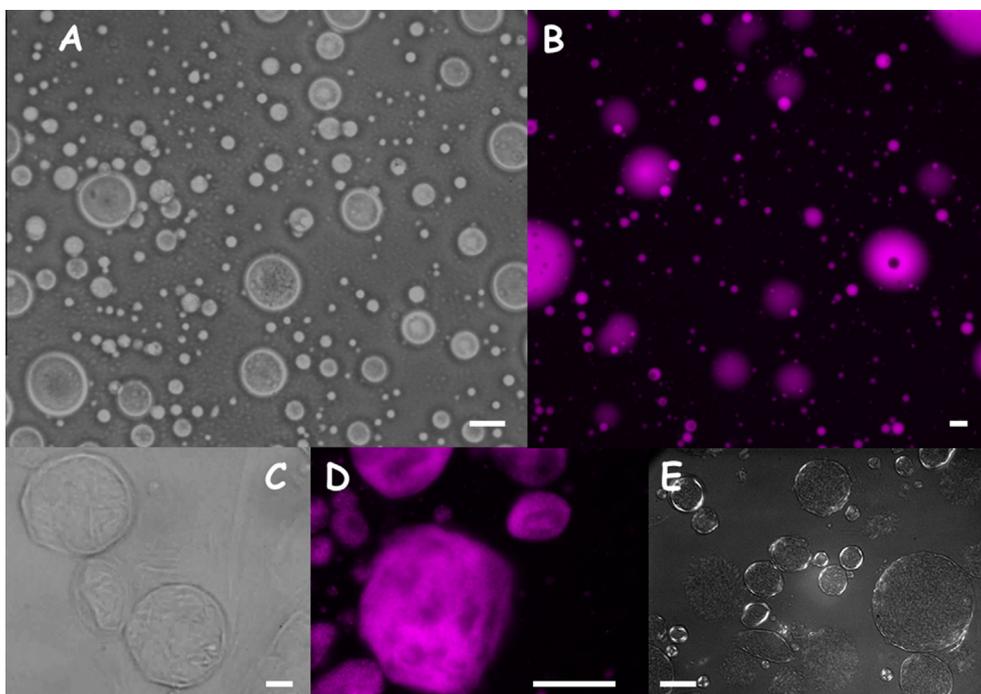


Fig. 2. Microscopy images of droplets in the system MyNaGu, (myristic acid, NaOH, GuHCl molar ratio 1/1/2, 10 mg/mL My). Images A and B are those for droplets at 25 °C observed by phase contrast microscopy and epifluorescence (using Nile red), respectively. Image for the sample at the same temperature obtained by cross-polarized microscopy returns a fully black background (not shown) consistent with isotropic structures present in the sample. Images C and D are those for droplets at 15 °C observed by phase contrast microscopy and epifluorescence (using Nile red), respectively. Image E is at the same temperature but obtained by cross polarized microscopy showing birefringent domains that account for anisotropic structures. The scale bars stand for 10 μm.

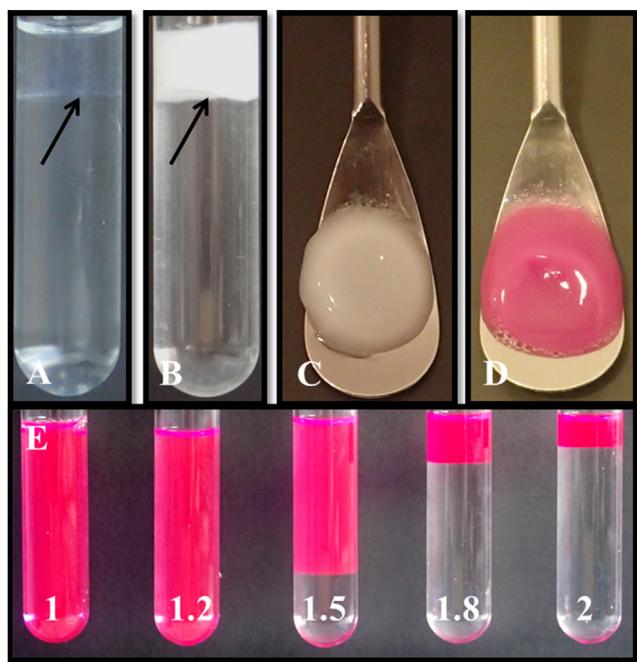


Fig. 3. Sample photographs in the system MyNaGu, (molar ratio $1/1/x$, 10 mg/mL My). Photos A–D are for $x=2$. (A) Sample tube photo obtained after letting the sample rest at 30 °C for 1 h, thus allowing phase separation. (B) Sample tube photo for the same sample as in (A) except that the tube was further placed 15 min in a water bath at 10 °C. Arrows show the phase separation as eye guide. Photos C and D (+ Nile red) show the sLCFA enriched pellet recovered from a cold sample using a spatula from for instance the tube shown photo B. (E) Sample tube images of samples in the presence of Nile red as obtained by varying x as indicated on tubes.

ratios of $1/1/2$) the volume of the upper phase became about $1/5$ of the total volume. This feature is further quantified by neutron scattering experiments.

3.3. Structural characterization

Droplets were also produced using perdeuterated myristic acid (per- ^2H -My) allowing a study by solid state NMR. Above the smooth to rough transition, an isotropic line was detected (Fig. 4A, at 25 °C), which is consistent with My embedded in micelles (fast tumbling motion in the NMR time scale). This result is similar to that observed previously in the stock solution that did not cloud [27]. Again, this then suggests a similar polymorphism, i.e., micelles would be present in droplets above the transition. It is however noteworthy that elongated, spherical or wormlike micelles would all yield an isotropic peak by NMR so that this technique does not allow differentiating the exact structure of the micelles within droplets.

Below the smooth to rough transition, the spectrum of these droplets exhibited a very wide “powder pattern” line shape with two main components, having quadrupolar splittings (separation between most intense peaks) of about 56 kHz and 16 kHz. The values are very similar to those observed in other sLCFA systems that were shown to form stacked bilayers [32,34] suggesting that fatty acids within droplets at that temperature also form stacked bilayers. It is noteworthy that sLCFA, although they exhibit weak dynamics in such stacked bilayers, are not crystallized in droplets. In this case, the quadrupolar splittings of the two main components would be 125 kHz and 37 kHz instead of 56 kHz and 16 kHz, respectively.

In order to obtain another quantitative view of the sLCFA arrangement within droplets, we performed Small-Angle Neutron

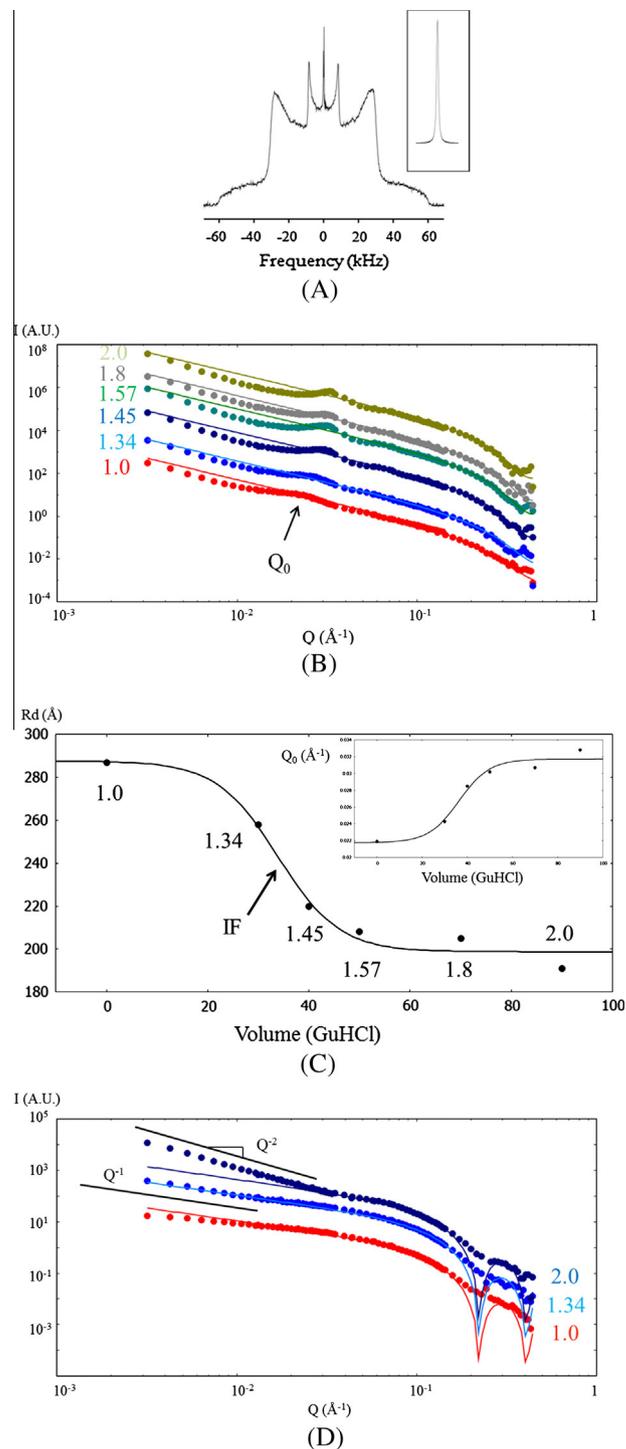


Fig. 4. NMR and SANS in the system MyNaGu, (molar ratio $1/1/x$, 10 mg/mL perdeuterated My). (A) ^2H solid state NMR spectra for the sample at 25 °C (inset) and at 15 °C obtained for $x=2$. (B) Small-angle neutron scattering (SANS) spectra showing the intensity vs. Q as obtained as a function of x as indicated on the top left for samples at 15 °C. (C) Plot of the repeat distance (R_d) as a function of the excess volume of GuHCl. The molar ratio in GuHCl, x , is also indicated. The inset shows the variation of the first order Bragg peak (Q_0) as a function of the excess volume of GuHCl. The arrow stands for the inflection point. (D) SANS spectra showing the intensity vs. Q obtained as a function of x as indicated on the top right for samples at 30 °C. To guide eyes, slopes Q^{-1} and Q^{-2} are shown for $Q \rightarrow 0$.

Scattering, SANS, experiments above (30 °C) and below (10 °C) the smooth to rough transition of the system myristic acid/NaOH/GuHCl ($1/1/x$) at 10 mg/mL My, varying ‘ x ’ from 1 to 2 (excess of GuHCl). The values of ‘ x ’ were chosen so that 4 samples

clouded and 2 others did not. Samples were heated (60 °C) above the cloud point and further poured in the neutron cell. They then clouded within the cell upon cooling allowing a study of the My polymorphism within droplets.

At low temperature, the spectra obtained as a function of 'x' are qualitatively, and even quantitatively very similar (Fig. 4B). They underwent a strong small-angle scattering signal but also displayed distinct—though not very sharp—first order Bragg peaks at Q_0 , the position of which shifted to higher Q upon increasing the amount of GuHCl (Fig. 4B). This indicated, in nice agreement with the NMR and microscopy findings, that sLCFA within droplets are embedded in stacked and ordered bilayers at 10 °C. It is noteworthy that these data also show that sLCFA did not crystallize at that temperature since sLCFA crystals would yield a power law of Q^{-4} for $Q \rightarrow 0$ by SANS and one rather observed a slope of -2 that is consistent with the formation of non-crystallized bilayers.

Even in the absence of observable higher-order Bragg peaks, one can nonetheless obtain the repeat distance $2\pi/Q_0$ that stands for the thickness of the water layer between the sLCFA bilayers plus that of the bilayer. The collected data are displayed as a function of the volume of GuHCl added in excess (Fig. 4C). The repeat distance decreased with the increase in GuHCl volume and data could be well fitted with a sigmoid curve. Interestingly, the inflection point of the curve occurred at a volume (or x value of 1.4) that matched nicely with the lower limit above which clouding was observed.

At higher temperature above the smooth to rough transition but still below the cloud point, because samples macroscopically phase separated in the neutron cells upon heating due to the coalescence of droplets, one could record reliable data only for 3 samples, the 2 first for which no clouding occurred and the one at the higher GuHCl molar ratio that is more viscous and did not phase separate during acquisition in the 2 mm thick neutron cell. The spectra shown in Fig. 4D became qualitatively different from those observed at lower temperature (see above). The Bragg peaks were no longer observed and, though the spectra still exhibited a strong small-angle scattering signal, the increase as $Q \rightarrow 0$ varied with 'x'. The SANS spectra were fitted with the model of an elongated cylinder of radius R detailed in the materials and methods section. Without excess of GuHCl, for $x = 1$, the experimental data were

below the fitting curve as $Q \rightarrow 0$ (Fig. 4C), with a power law of about $Q^{-0.8}$. This means that, in the present experimental conditions, micelles are neither spherical nor equivalent to long rigid cylinders, probably still having a cylindrical shape, the length of the cylinder being of the order of the radius, i.e., elongated micelles form [35]. Upon addition of excess GuHCl, but for the sample that still did not cloud, i.e., for $x = 1.34$, the experimental data were well fitted by the model even for $Q \rightarrow 0$, showing that elongated micelles increased in length and became straighter. At high GuHCl molar ratio for the sample that clouded, for $x = 2$, the scattering intensity as $Q \rightarrow 0$ was much above the fitting curve and exhibited an apparent power law as Q^{-2} . This presumably means that, for such a high molar ratio, *attractive interactions* are strong enough for the structure factor to depart significantly from the ideal limit. Interestingly, variation of the power law as $Q \rightarrow 0$ and corresponding exponents as a function of the micellar shape and flexibility is well documented in the literature [35–37].

These SANS data suggest that, without excess of GuHCl, i.e., for $x = 1$, micelles are elongated and their size increases upon addition of excess GuHCl. Moreover, in the clouding domain, the higher the excess of GuHCl, the lower the volume of the sLCFA enriched upper phase, showing that attractions between micelles increase. This is well evidenced by visual inspection (see above, Fig. 3E) but also more quantitatively from the neutron scattering data at low temperature that show a decrease of the spacing between myristic acid bilayers upon increasing the amount of GuHCl. The spacing first decreases progressively and a sudden variation occurs at the clouding limit, releasing water yielding the phase separation.

3.4. Dye sequestration in sLCFA-rich droplets

Triton X114 is well known to cloud and also phase separate and this property has long been used for extracting membrane proteins [38]. One then further questioned whether our sLCFA droplets could also be used for extracting solutes. One focused on the sequestration of dyes by visual inspection since the coloration of phases after phase separation occurs is a direct evidence of this extraction phenomenon. Moreover, studying each phase by UV absorption spectroscopy allows a quantitative determination of the dye sequestration. We then studied the sequestration of

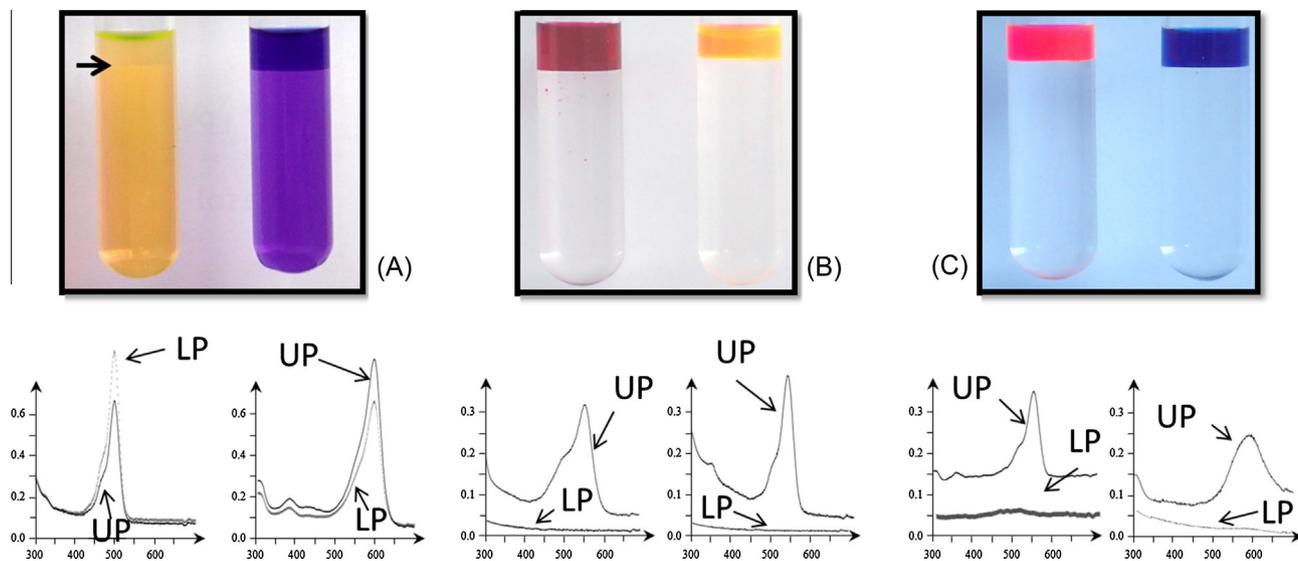


Fig. 5. Sample tube images and UV-visible absorption spectra in the system MyNaGu, (molar ratio 1/1/2, 10 mg/mL in My) in the presence of various dyes. Sample tube photos were obtained after letting the sample rest at 30 °C for 1 h allowing phase separation. (A) From left to right, sample tubes contained calcein and bromocresol purple, the arrow shows the phase separation limit to guide the eyes. The UV-visible spectra (absorbance (arbitrary units) vs. wave length (nm)) are shown in the same order from left to right. UP and LP stand for the upper and the lower phases, respectively. (B) From left to right, sample tubes contained basic fuchsin and rhodamin 6G. (C) From left to right, sample tubes contained rhodamin B and brilliant blue R.

solutes in sLCFA-rich droplets by using a panel of 30 organic dyes, the chemical structure of which differed by the charge and the lipophilicity as illustrated in the supporting material section (S.M. 1). The sequestration of the dyes was only studied above the smooth to rough transition temperature, i.e., when droplets are filled with wormlike micelles.

We defined a partition coefficient, P_{droplets} , as the molar ratio between the numbers of dyes dispersed per unit volume in the upper sLCFA rich-phase vs. that in the lower phase. P_{droplets} is expected to give a relative characterization of the dye sequestration within droplets. Additional details and information are given in [supplementary material, S.M. 1](#).

The data one obtained for selected dyes in the myristic acid system are reported in [Fig. 5](#) and are commented hereafter. One started with negatively charged dyes and report data in the case of calcein and bromocresol purple ([Fig. 5A](#)), seven other negatively charged dyes were also investigated (see [supporting material S.M. 1A](#)). Since both phases are colored, this means that these dyes are not preferentially sequestered in the My rich upper phase. For bromocresol purple ([Fig. 5A right](#)), the spectrum of the upper phase (UP) was more intense than that of the lower phase (LP) by a factor 1.3, yielding a $\log(P_{\text{droplets}})$ of 0.11. In the case of calcein which is much more polar ($\log(P_{\text{octanol}}) < 0$, see [S.M. 1](#)), the spectrum of the lower phase ([Fig. 5A left](#)) was more intense than that of the upper phase meaning that this dye was partly rejected from the sLCFA-rich phase with a $\log(P_{\text{droplets}})$ in that case of -0.15 . As could be expected because sLCFA are negatively charged, negatively charged dyes are not sequestered within droplets but interestingly, they are not fully rejected.

14 cationic dyes were investigated and UV-visible data are only reported for basic fuchsin and rhodamin 6G ([Fig. 5B and S.M. 1B](#)). By contrast with the negatively charged dyes, all positively charged dyes were recovered within the upper phase since no coloration was observed in the lower phase. Interestingly, polar dyes ($\log(P_{\text{octanol}}) < 0$, see [S.M. 1](#)) as basic fuchsin, toluidine blue and methyl green are also fully sequestered in the upper phase. This was also evidenced from the UV-Visible spectra since no absorbance peak was observed in the lower phase. The partition coefficient P_{droplets} was then infinite in these cases. Such a result could be expected since positively charged dyes can interact with the negatively charged surface of the elongated micelles made of sLCFA.

We then investigated the sequestration of six zwitterionic dyes; amongst which are rhodamine 6B and brilliant blue R. As for positively charged dyes, all these dyes were totally recovered in the upper phase ([Fig. 5C and S.M. 1C](#)).

Altogether, these results suggest that positively charged and zwitterionic solutes could be sequestered within droplets, whereas negatively charged solutes would not be. Although it could logically be expected for positively charged dyes (see above), this result is more surprising in the case of zwitterionic dyes. We believe that these latter dyes although they bear negatively charged groups, also bear positively charged moieties which can indeed interact with the negatively charged elongated micelles made of sLCFA present within droplets. This suggests that amino acids and proteins which are also zwitterionic molecules could be extracted by using these systems and we are exploring this feature in the future.

4. Conclusions

We report here a novel case of a charged surfactant which exhibit clouding phenomenon. Whereas in general, the clouding of charged surfactants occurs in the presence of high amount of salt which screen electrostatic repulsions, here it is induced by

the presence of GuHCl which form hydrogen bonds reinforcing attractive interactions between micelles. These systems allow for the extraction of solutes such as dyes and we are exploring the sequestration of more biological molecules in the future. Besides, the formation of sLCFA enriched droplets upon clouding appears to be comparable to coacervate droplets that are built by mixing counter-charged polyelectrolytes or neutral polymers [39–46]. Altogether, we can then suggest that these sLCFA droplets could be developed as novel compartments or bioreactors in the future. Moreover, it is well known that various protocell models are based on fatty acid vesicles because these lipids were the most simple amphiphiles that could be present in prebiotic times [47]. Then, the sLCFA droplets could also be potential models of protocells. We then believe that our findings are of interest for research based on compartmentalization, including protocells, bioreactors and minimal cells and for the extraction, purification and encapsulation of solutes of biological interest.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.01.049>.

References

- [1] K. Shinoda, S. Friberg, *Emulsions and Solubilization*, Wiley, New York, 1986.
- [2] T.K. Hodgdon, E.W. Kaler, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 12 (2007) 121.
- [3] S.R. Raghavan, H.k. Edlund, E.W. Kaler, *Langmuir* 18 (2002) 1056.
- [4] G.G. Warr, T.N. Zemb, M. Drifford, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 3086.
- [5] B.L. Bales, R. Zana, *Langmuir* 20 (2004) 1579.
- [6] D. Kabir-ud, D. Sharma, Z.A. Khan, V.K. Aswal, S. Kumar, *J. Colloid Interface Sci.* 302 (2006) 315.
- [7] G.C. Kalur, S.R. Raghavan, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 8599.
- [8] S. Kumar, V.K. Aswal, A.Z. Naqvi, P.S. Goyal, D. Kabir-ud, *Langmuir* 17 (2001) 2549.
- [9] S. Kumar, D. Sharma, Z.A. Khan, D. Kabir-ud, *Langmuir* 17 (2001) 5813.
- [10] S. Kumar, D. Sharma, Z.A. Khan, D. Kabir-ud, *Langmuir* 18 (2002) 4205.
- [11] R. Zana, M. Benrraou, B.L. Bales, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 18195.
- [12] A.-L. Fameau, T. Zemb, *Adv. Colloid Interface Sci.* 207 (2014) 43.
- [13] J.-P. Douliez, C. Gaillard, *New J. Chem.* 38 (2014) 5142.
- [14] L. Chiappisi, H. Yalcinkaya, V.K. Gopalakrishnan, M. Gradzielski, T. Zemb, *Colloid Polym. Sci.* 293 (2015) 3131–3143.
- [15] M. Dubois, B. Deme, T. Gulik-Krzywicki, J.-C. Dedieu, C. Vautrin, S. Desert, E. Perez, *T. Zemb, Nature* 411 (2001) 672.
- [16] Y. Michina, D. Carriere, T. Charpentier, R. Brito, E.F. Marques, J.-P. Douliez, T. Zemb, *J. Phys. Chem. B* 2010 (1932) 114.
- [17] T. Zemb, M. Dubois, B. Demé, T. Gulik-Krzywicki, *Science* 283 (1999) 816.
- [18] J.W. McBain, *J. Am. Chem. Soc.* 50 (1928) 1636.
- [19] M. Randall, J.W. McBain, A.M. White, *J. Am. Chem. Soc.* 48 (1926) 2517.
- [20] D.P. Cistola, D. Atkinson, J.A. Hamilton, D.M. Small, *Biochemistry* 25 (1986) 2804.
- [21] P.A. Kralchevsky, K.D. Danov, C.I. Pishmanova, S.D. Kralchevska, N.C. Christov, K.P. Ananthapadmanabhan, A. Lips, *Langmuir* 23 (2007) 3538.
- [22] R. Zana, *Langmuir* 20 (2004) 5666.
- [23] R. Zana, J. Schmidt, Y. Talmon, *Langmuir* 21 (2005) 11628.
- [24] R. Klein, M. Kellermeier, M. Drechsler, D. Touraud, W. Kunz, *Colloid Surf. A* 338 (2009) 129.
- [25] Regina Klein, Didier Touraud, W. Kunz, *Green Chem.* 10 (2008) 433.
- [26] A. Arnould, A.A. Perez, C.d. Gaillard, J.-P. Douliez, F. Cousin, L.G. Santiago, T. Zemb, M. Anton, A.-L. Fameau, *J. Colloid Interface Sci.* 445 (2015) 285.
- [27] J.-P. Douliez, B. Houinsou-Houssou, A.-L. Fameau, B. Novales, C. Gaillard, *J. Colloid Interface Sci.* 341 (2010) 386.
- [28] A.-L. Fameau, B. Houinsou-Houssou, J. Ventureira, B. Novales, L. Navailles, F. Nallet, J.-P. Douliez, *Langmuir* 27 (2011) 4505.
- [29] P. Blondeau, M. Segura, R. Perez-Fernandez, J. de Mendoza, *Chem. Soc. Rev.* 36 (2007) 198.
- [30] F. Mathevet, P. Masson, J.-F. Nicoud, A. Skoulios, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 9053.
- [31] A. Pantos, I. Tsogas, C.M. Paleos, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 811.
- [32] J. Davis, *Biochim. Biophys. Acta* 737 (1983) 117.
- [33] O. Glatter, O. Kratky, *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, London, 1982, p. 3.
- [34] J.-P. Douliez, L. Navailles, F. Nallet, *Langmuir* 22 (2006) 622.
- [35] I.W. Hamley, J.S. Pedersen, C. Booth, V.M. Nace, *Langmuir* 17 (2001) 6386.
- [36] C.A. Dreiss, *Soft Matter* 3 (2007) 956.
- [37] G. Beaucage, *J. App. Cryst.* 29 (1996) 134.
- [38] W.L. Hinze, E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993) 133.

- [39] A.I. Oparin, in: D. Publishing (Ed.), *The Origin of Life*, New York, 1953.
- [40] T.Y. Dora Tang, C. Rohaida Che Hak, A.J. Thompson, M.K. Kuimova, D.S. Williams, A.W. Perriman, S. Mann, *Nat. Chem.* 6 (2014) 527.
- [41] A.J. Dzieciol, S. Mann, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 79.
- [42] S. Koga, D.S. Williams, A.W. Perriman, S. Mann, *Nat. Chem.* 3 (2011) 720.
- [43] S. Mann, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 155.
- [44] D.C. Dewey, C.A. Strulson, D.N. Cacace, P.C. Bevilacqua, C.D. Keating, *Nat. Commun.* (2014) 5.
- [45] C.D. Keating, *Acc. Chem. Res.* 45 (2012) 2114.
- [46] C.A. Strulson, R.C. Molden, C.D. Keating, P.C. Bevilacqua, *Nat. Chem.* 4 (2012) 941.
- [47] K. Morigaki, P. Walde, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 12 (2007) 75.

SUPPORTING MATERIAL

Clouding in fatty acid dispersions for charge-dependent dye extraction

David Garenne ^a, Laurence Navailles ^b, Frédéric Nallet ^b, Axelle Grélard ^c, Erick J. Dufourc ^c and Jean-Paul Douliez ^{a*}

^a UMR 1332, biologie et pathologie du fruit, INRA, centre de Bordeaux, 33883 Villenave d'Ornon, France. ^b Université de Bordeaux, Centre de recherche Paul-Pascal,-CNRS, Av. A. Schweitzer, 33600 Pessac, France. ^c Institute of Chemistry and Biology of Membranes and Nano-objects, UMR 5248, CNRS, Université de Bordeaux, Institut Polytechnique Bordeaux, F-33600 Pessac, France.

S.M. 1: dye sequestration.

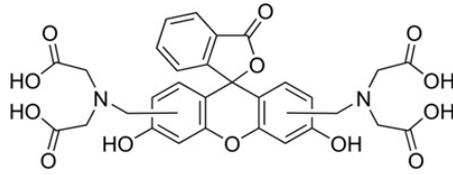
The sequestration of dyes and chemicals in general, in one or another phase is often characterized by a partition coefficient, P . For instance, a partition coefficient between octanol and water can be defined as the molar ratio between the numbers of un-ionized dyes dispersed per unit volume in octanol vs. that in water. Then, lipophilic dyes exhibit a positive value of $\log(P_{\text{octanol}})$ whereas it is negative for hydrophilic dyes. It is also convenient to use a partition coefficient, D , that takes into account both the un-ionized and the ionized forms of the dye and it is used as $\log(D)$. It is noteworthy that $\log(D)$ depends on the pH. Both partition coefficients were collected for all dyes (see www.chemicalize.org) and are reported on the bottom left. The sequestration of about 30 dyes was studied and results are reported here-after. The chemical structure for each dye is shown and was obtained from <http://www.sigmaaldrich.com/catalog>. A sample tube photo is shown allowing visualization of the colored dye in the upper and lower phases, experimental conditions are identical as those used for figure 5 (main text).

SM1 A) Negatively charged dyes:

Calcein



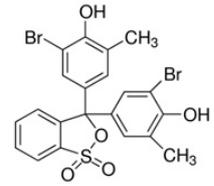
-4.04/-4.04



Bromocresol purple



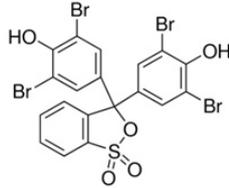
6.67/5.16



Bromophenol blue



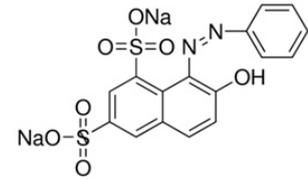
7.18/3.62



Orange G



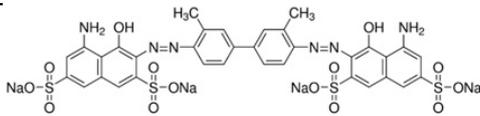
-0.89/-1.92



Trypan Blue



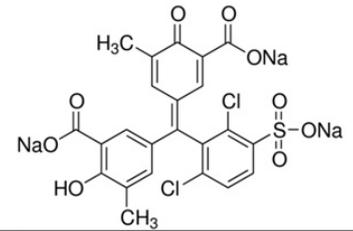
-1.35/-1.35



Chromezurol S



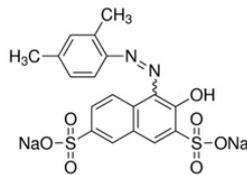
5.35/-3.25



Ponceau Xylidine



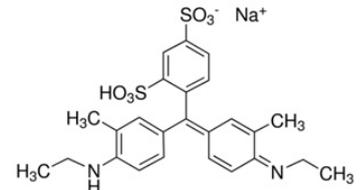
0.56/-1.2



Xylene cyanol



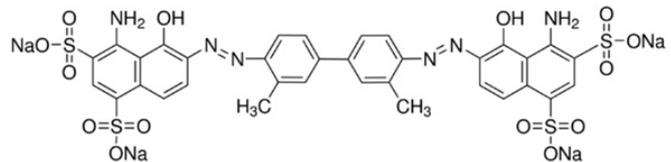
1.88/0.04



Evans Blue



-1.12/3.94

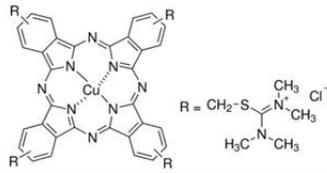


SM1 B) Positively charged dyes

Alcian blue



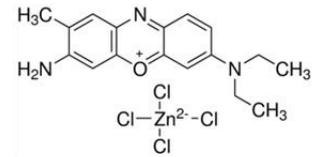
-4.05/-4.05



Brilliant cresyl blue



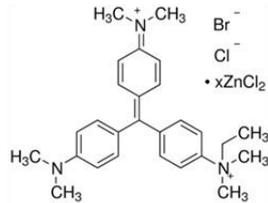
-3.25/-2,37



Methyl green



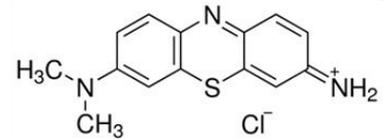
-2.30/-1.15



Giemsa stain



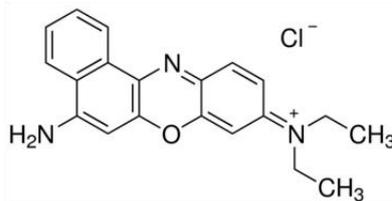
-1.56/-1.07



Nile Blue



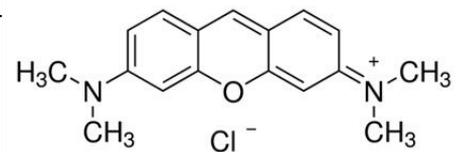
4.55/4.55



Pyronin Y



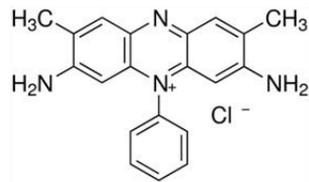
2.37/4.08



Safranin O



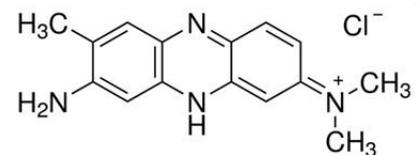
0.81/1.15



Neutral Red



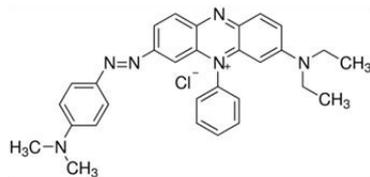
2.85/2.85



Janus green



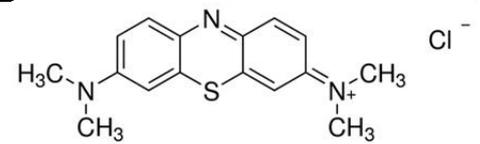
4.78/4.78



Methylene blue



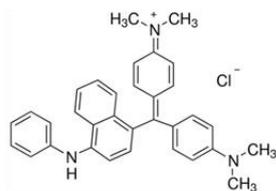
2.61/2.89



Victoria blue



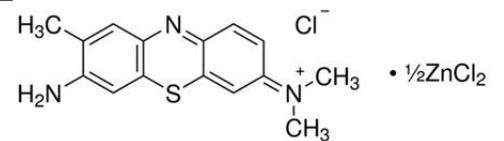
4.68/4.68



Toluidine Blue



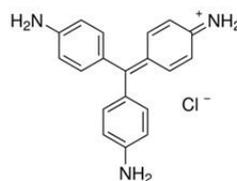
-1.04/-0.46



Basic Fuchsin



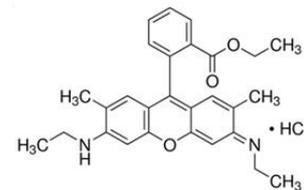
3.33/2.09



Rhodamine 6G

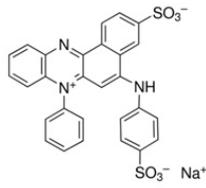


6.71/6.71



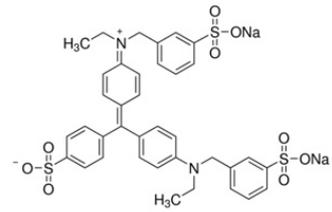
SM1 C) Both negatively and positively charged dyes:

Azocarmine G



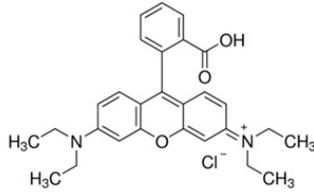
1.96/2.41

Light green



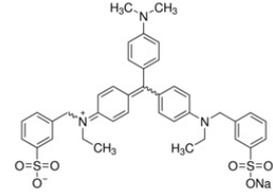
0.31/-3.15

Rhodamine B



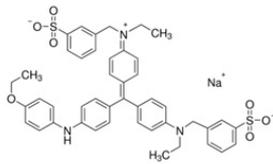
1.78/3.15

Violet Acid 49



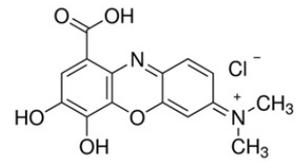
2.45/0.12

Brilliant Blue R



2.65/1.6

Gallocyanine



0.45/-2.25

2) Résumé de la publication

L'objectif de ce projet est de mettre en évidence la formation de compartiments semblables aux coacervats à partir d'acides gras saturés à longues chaînes ainsi que de guanidine. Dans ce système d'étude, les acides gras sont capables de former des micelles allongées en solution en présence de guanidine (Douliez *et al.*, 2016). Les micelles allongées diluées sont capables de former des vésicules en diminuant le pH ou en ajoutant du décanol. Cependant aucune séparation de phases n'a encore été mise en évidence avec les micelles allongées.

Des solutions équimolaires d'acides gras saturés à longues chaînes (acide myristique C : 14, acide palmitique C :16, acide stéarique C :18), de soude et de guanidine forment des micelles allongées. L'augmentation du ratio de guanidine dans ces systèmes équimolaires permet l'observation d'un phénomène qualifié de trouble en fonction de la température (ratio 1.4, 1.3 et 1.2 pour les acides myristique, palmitique et stérique respectivement). L'observation au microscope à fond noir montre la présence de gouttes dont la taille varie (1 à 50 μ m) (Figure 24). En présence de rouge de Nile (sonde hydrophobe), les gouttes sont fluorescentes, suggérant un enrichissement en acides gras.

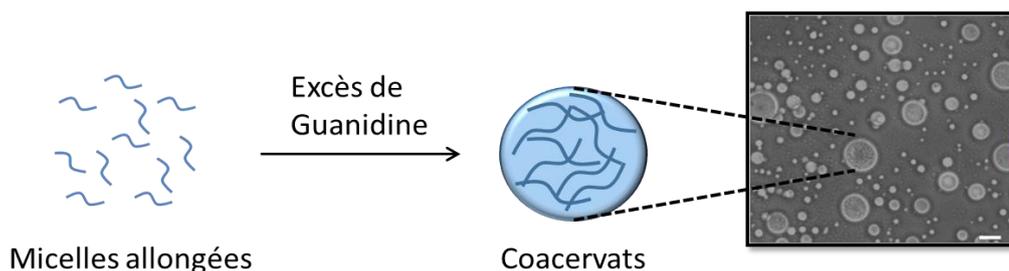


Figure 24 : Gouttes d'acides myristique en présence de NaOH et d'un excès de guanidine.

Images de microscopie à contraste de phase du système MaNaGu (Acide myristique/NaOH/Guanidine, ratio molaire 1/1/1.5) à 25°C et à pH 9.5. Les barres d'échelle représentent 50 μ m.

Lorsque les échantillons sont incubés au-dessus d'une certaine température appelée température de transition (21, 33 et 50°C pour les acides myristiques, palmitiques et stéariques respectivement), les études de RMN et de diffusion de neutrons confirment la présence de micelles allongées pouvant interagir ensemble en présence d'un excès de guanidine formant ainsi des coacervats. Une séparation de phase se produit grâce à la coalescence des coacervats au cours du temps en solution. Ce phénomène permet alors l'obtention d'une phase riche en acides gras à la surface de l'échantillon pouvant être prélevée manuellement. Le volume de la phase d'acides gras est dépendant de la quantité de guanidine rajoutée.

En dessous de la température de transition, les résultats de RMN et de diffusion de neutrons montrent que les acides gras s'arrangent en bicouches. De plus ces méthodes montrent aussi que la guanidine empêche la cristallisation des acides gras à basse température (Figure 25).

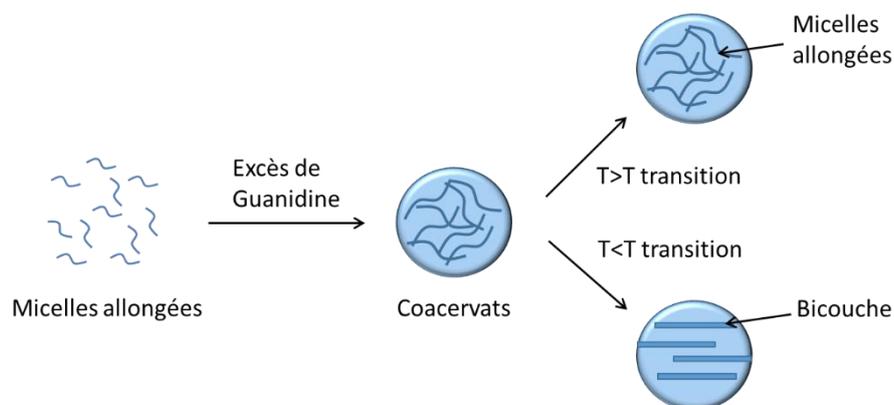


Figure 25 : Organisation des acides gras en fonction de la température.

Représentation de l'organisation des acides gras à l'intérieur des coacervats en fonction de la température. Lorsque la température est supérieure à la température de transition, les coacervats sont formés de micelles allongées. Lorsque la température diminue sous la température de transition, les acides gras initialement structurés en micelles forment alors des bicouches.

L'utilisation de sondes chargées nous a permis de mettre en évidence un phénomène de séquestration dépendant de la charge des sondes. Ainsi, les sondes chargées positivement sont toutes majoritairement séquestrées dans les coacervats, malgré le fait que certaines

soient hydrophiles (Bleu Alcian) et d'autres hydrophobes (Rouge de Nile). En ce qui concerne les sondes chargées négativement, celles-ci ne sont pas séquestrées préférentiellement comme nous avons pu l'observer avec les sondes chargées positivement. Les sondes chargées négativement mais possédant au moins une charge positive sont quant à elle séquestrées majoritairement dans les coacervats.

3) Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre en évidence la formation d'un compartiment basé sur l'interaction de micelles allongées d'acides gras saturés à longues chaînes en solution. Ce compartiment forme alors des coacervats en présence d'un excès de guanidine et au-dessus d'une température appelée température de transition. En dessous de cette température de transition, les acides gras se structurent en bicouches. Ce compartiment est capable de séquestrer des molécules en fonction de leurs charges. Les sondes chargées positivement sont séquestrées dans les coacervats probablement dû à une interaction entre la sonde et l'acide gras. Les sondes chargées négativement quant à elle ne sont pas séquestrées spécifiquement dans les coacervats. Il est intéressant de noter que les sondes chargées négativement, mais possédant au moins une charge positive, sont séquestrées à l'intérieur des coacervats. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une charge positive peut suffire à interagir avec les acides gras et qu'il existe potentiellement un ratio de charges positives nécessaires pour séquestrer une molécule dont la charge globale est négative.

Trois acides gras différents ont permis la formation de coacervats comme compartiment pour séquestrer des sondes moléculaires. Cependant, les températures permettant la formation de coacervats des acides stéarique et palmitique (33 et 50°C) semblent moins compatibles avec les gammes de températures du vivant que ne l'est celle de l'acide myristique (21°C). Ceci explique le choix que nous allons faire par la suite de n'utiliser que l'acide myristique pour les expériences impliquant la séquestration de protéines.

Chapitre 2

Etude de l'encapsulation de biomolécules dans des vésicules d'acides gras à travers la séquestration dans les coacervats

1) Publication

Les résultats obtenus pour ce second chapitre de thèse ont été publiés dans *Angewandte Chemie* sous le titre « Sequestration of Proteins by Fatty Acid Coacervates for Their Encapsulation within Vesicles. »

Encapsulation

International Edition: DOI: 10.1002/anie.201607117

German Edition: DOI: 10.1002/ange.201607117

Sequestration of Proteins by Fatty Acid Coacervates for Their Encapsulation within Vesicles

David Garenne, Laure Beven, Laurence Navailles, Frédéric Nallet, Erick J. Dufourc, and Jean-Paul Douliez*

Abstract: Encapsulating biological materials in lipid vesicles is of interest for mimicking cells; however, except in some particular cases, such processes do not occur spontaneously. Herein, we developed a simple and robust method for encapsulating proteins in fatty acid vesicles in high yields. Fatty acid based, membrane-free coacervates spontaneously sequester proteins and can reversibly form membranous vesicles upon varying the pH value, the precrowding feature in coacervates allowing for protein encapsulation within vesicles. We then produced enzyme-enriched vesicles and show that enzymatic reactions can occur in these micrometric capsules. This work could be of interest in the field of synthetic biology for building microreactors.

Encapsulating biological materials in vesicles constitutes a step towards the production of minimal and synthetic cells and is therefore of significant interest in the field of synthetic biology and for our understanding of the origin of life.^[1,2] Spontaneous overcrowding of biochemicals can occur in some cases when producing vesicles but it remains rare.^[3,4] With classical procedures, upon hydration of lipids, a small amount of biological materials can be spontaneously encapsulated within vesicles when they are produced.^[5] An encapsulation method known as the “droplet transfer method” has been developed and further successfully been used for producing artificial cells.^[6–8]

Coacervates, which can form from polyelectrolytes and/or countercharged or neutral polymers dispersed in water, for example,^[1,9,10] spontaneously sequester biomolecules. A hybrid model based on polyelectrolyte-based coacervates covered by a fatty acid bilayer has recently been developed and combines the advantages of both coacervates and vesicles.^[11] However, such coacervates form only at high

polymer concentrations (≥ 1 wt %) and/or require expensive polyelectrolytes (e.g., ATP, polylysine).

Surfactant and lipid systems can form coacervate-like droplets under particular experimental conditions (clouding phenomenon).^[12] Surfactant coacervation has mainly been studied in the field of colloid science,^[10] but to the best of our knowledge, there are no known examples of utilizing such systems as bio-compartments. We have recently developed a system based on fatty acids that forms coacervates^[13] and have also independently shown that these fatty acids can form stable vesicles.^[14] Herein, we first show that reversible transitions from coacervates into vesicles can be achieved by varying the pH. Next, we demonstrate that proteins are spontaneously sequestered into the membrane-free coacervates. This precrowding feature allows for the encapsulation of proteins within vesicles in high yields using the coacervate \rightarrow vesicle transition. Finally, vesicles with encapsulated enzymes were produced to conduct reactions within the vesicles.

According to the literature in this field,^[15–17] vesicles can be readily obtained from coacervates (10 mg mL⁻¹ myristic acid (My), My/NaOH/guanidine hydrochloride molar ratio: 1:1:2, pH 9.5; see the Supporting Information, Section S1) by mild changes in the conditions, by either decreasing the pH value (to pH 8) or by adding an alkanol to the coacervate dispersion (Section S1 and Figure S2). The transition between coacervates and vesicles was visualized by microscopy as a change of size occurs, coacervates exhibiting a diameter of about 5–50 μ m whereas that of vesicles does not exceed 5 μ m (Figure 1). The variation of the pH value allows for reversible transitions between coacervates and vesicles and the realization of up to ten transitions (not shown). The formation of vesicles starting from coacervates was confirmed by solid-state NMR spectroscopy (Figure 1F); a broad resonance was observed, which is characteristic of lipids embedded in bilayer assemblies.^[14,18] As both coacervates and vesicles have previously been separately characterized by various techniques,^[13,14] we can suggest in the present study that coacervates formed at pH 9.5 and vesicles at pH 8.

The use of alkanol did not allow for reversible transitions as the alkanol was inserted within the fatty acid bilayers of the vesicles (Figures 1 and S2). However, it was still of interest because the presence of alkanol is well known to increase the range of pH values in which fatty acid vesicles form.^[14,16] The present system then 1) combines advantages of both coacervates and vesicles in a unique system and 2) enables transitions between both these structures.

We further questioned whether our fatty acid coacervates could sequester proteins as previously described for poly-

[*] D. Garenne, Dr. L. Beven, Dr. J.-P. Douliez
UMR 1332, biologie et pathologie du fruit, INRA
centre de Bordeaux, 33883 Villenave O'Ornon (France)
E-mail: jean-paul.douliez@bordeaux.inra.fr

Dr. L. Navailles, Prof. F. Nallet
Université de Bordeaux
Centre de Recherche Paul-Pascal, CNRS
av. A. Schweitzer, 33600 Pessac (France)
Dr. E. J. Dufourc
Institute of Chemistry and Biology of Membranes and Nano-objects
UMR 5248, CNRS, université de Bordeaux
Institut polytechnique Bordeaux
33600 Pessac (France)

Supporting information for this article can be found under:
<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201607117>.

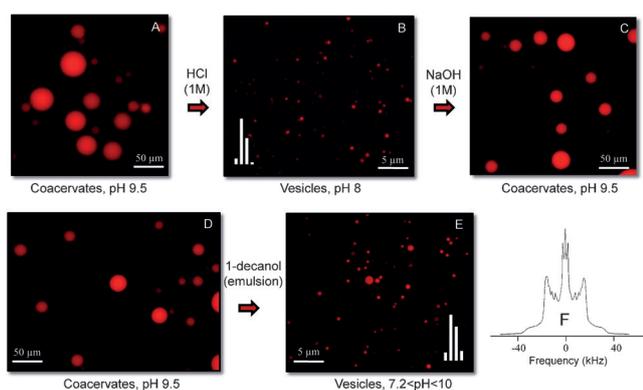


Figure 1. Epifluorescence micrographs of A) coacervates (10 mg mL^{-1} My, My/NaOH/guanidine hydrochloride molar ratio: 1:1:2, pH 9.5; Section S1) labeled with Nile Red. B) Vesicles formed after acidification (pH 8) of the coacervate dispersion. The vertical bars are a histogram of the size distribution, from left to right: $< 1 \mu\text{m}$, $1 \mu\text{m}$, $2 \mu\text{m}$, $> 2 \mu\text{m}$. C) Coacervates (pH 9.5) re-formed upon addition of NaOH from the previous vesicular dispersion. D) Same dispersion as that in (A). E) Vesicles obtained from the coacervate dispersion upon addition of a 1-decanol emulsion (see Sections S1 and S2). The vertical bars are a histogram of the size distribution (see (B)). F) Solid-state deuterium NMR spectrum of the vesicles in (B).

electrolyte- and/or polymer-based coacervates.^[9,10] Coacervates were first produced (see the composition above and Section S1) in the presence of fluorescent proteins, namely self-fluorescent YFP and FITC-labeled ribonuclease A and catalase. Nile Red was also added to label the fatty acid coacervates. Yellow, $5\text{--}50 \mu\text{m}$ large dots, which represent the proteins, were observed by epifluorescence and confocal microscopy (Figure 2A and S3a) and were superimposed with red dots (Figure 2B and S3a), demonstrating that these proteins were indeed crowded into coacervates.

This crowding feature was further quantitatively analyzed for other proteins by making use of the fact that coacervates coalesce with time (1–2 h), further yielding a macroscopic phase separation (Figure 2C).^[13] The partitioning of proteins between the upper (fatty acid enriched)^[13] and lower phases was determined by UV/Vis absorption spectroscopy (Figure S3b,c). Obviously, whatever the isoelectric point (pI), the proteins were efficiently extracted into the fatty acid enriched phase, showing that they are mainly sequestered ($> 70\%$) into the coacervates. This was possible because proteins are zwitterionic biomolecules that contain free, positively

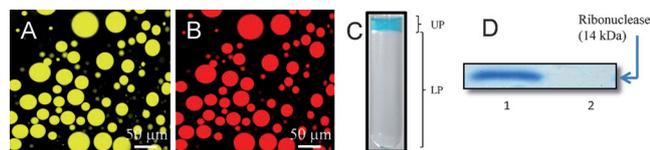


Figure 2. A, B) Confocal micrographs of coacervates containing A) YFP and B) Nile Red. C) Photograph of a sample tube showing macroscopic phase separation, here for the protein markers (blue) used for gel electrophoresis. D) SDS-PAGE gel electrophoresis of coacervates initially produced in the presence of 1) ribonuclease and 2) both ribonuclease and proteinase K. The full gel is shown in Figure S3 f.

charged amino acids that are thought to interact with the negatively charged fatty acids within coacervates. This behavior was also observed with zwitterionic organic dyes.^[13]

We also tested whether the sequestered enzymes were still functional within the coacervates. Coacervates were produced in the presence of enzymes such as horse radish peroxidase, glucose oxidase (Gox), and alkaline phosphatase (see Section S1). After phase separation, the upper and lower phases were recovered separately, and the enzyme substrates were added to each phase. Enzymatic reactions indeed occurred, mainly in the upper phases (Figures S3 d,e). We also prepared a coacervate dispersion to which both ribonuclease and proteinase K (a non-specific protease) were added. Gel electrophoresis showed that the protease fully digested the ribonuclease within coacervates as the band of that protein disappeared (Figure 2D, lane 2). This result confirmed that enzymes are easily sequestered within coacervates and are natively folded and still functional at pH 9.5 in the enriched fatty acid medium.

We then reasoned that because proteins can be pre-crowded into coacervates, this could enable encapsulation within vesicles upon the coacervate \rightarrow vesicle transition (Figure 3A). This was first demonstrated by epifluorescence analysis using fluorescent proteins. As initially described, fluorescent-protein-enriched coacervates (see Section S1) were transformed into vesicles by both decreasing the pH (pH 8) or upon addition of 1-decanol. Epifluorescence images showed red dots with a relative polydispersity centered about $1\text{--}2 \mu\text{m}$, confirming the presence of vesicles (Figures 3C and S4a). It should be noted that yellow dots representing the protein signal were also observed (Figures 3B and S4a) and were superimposed with the red dots (see Figure 3D). This suggests that these proteins had indeed been encapsulated within vesicles. Vesicles do not have a large enough diameter to be observed by confocal microscopy, which would confirm that proteins have indeed been encapsulated. However, we showed that proteins added once the vesicles had been formed were indeed located in the bulk (i.e., outside the

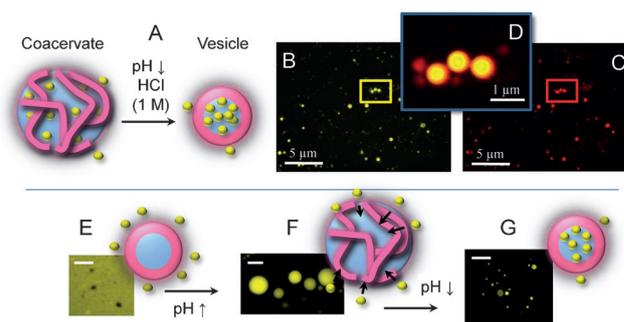


Figure 3. A) Schematic representation of the coacervate \rightarrow vesicle transition, suggesting that precrowding of proteins enables their encapsulation within vesicles upon the transition. B, C) Epifluorescence images showing vesicles obtained from coacervates enriched in B) FITC-catalase, and C) also labeled with Nile Red. D) An enlarged overlay is shown. E–G) A sequence of epifluorescence micrographs and the corresponding schemes illustrating that YFP added in the bulk can be encapsulated in vesicles by a reversible coacervate \rightarrow vesicle transition. The scale bars in (E)–(G) correspond to 5, 25, and $5 \mu\text{m}$, respectively.

vesicles; Figure S4b) and not adsorbed onto the vesicles nor spontaneously encapsulated within them. This result confirms that the proteins were indeed encapsulated within the vesicles upon the coacervate→vesicle transition.

We then demonstrated that proteins added to the bulk could be further encapsulated in vesicles upon a simple vesicle→coacervate→vesicle transition. Vesicles were formed from a coacervate dispersion (Section S1) upon decreasing the pH value (pH 8); then, the fluorescent protein was added, and located outside the vesicles (Figure 3E). Black dots lacking fluorescence surrounded by the fluorescence of the non-encapsulated proteins were observed (see also Figure S4b). The pH value was then increased to re-form coacervates (pH 9.5), and large yellow dots were observed, confirming that the proteins were now found within coacervates (Figure 3F). The pH value was again decreased (pH 8) to re-form vesicles. Small yellow dots were observed, showing that the proteins were encapsulated inside vesicles (Figure 3G). The fact that the coacervate→vesicle transition is reversible allows for iteratively or sequentially encapsulating proteins inside vesicles.

We then quantified the amount of proteins encapsulated in vesicles. Various protein-enriched vesicles were produced by using the above-mentioned method, and proteinase K was further added to digest non-encapsulated proteins (Figure S4c). Quantitative gel electrophoresis was then performed to determine the amount of non-digested protein. For instance, the initial experiment showed the level of ribonuclease A in the coacervates (Figure 4A, lane 1). After transformation into vesicles and digestion with proteinase K, the band intensity of ribonuclease A decreased. The intensity ratio of both bands (lane 1/lane 2) gives the relative amount of encapsulated protein. About 50% of the protein were not digested and thus had indeed been encapsulated within vesicles (Figure 4A,B). Similarly, the amount of encapsulated catalase was determined to be in the range of 40–60% (Figure 4B). Both methods (pH decrease vs. addition of alkanol) used to form vesicles from a coacervate dispersion yielded the same level of encapsulation (Figure 4A,B).

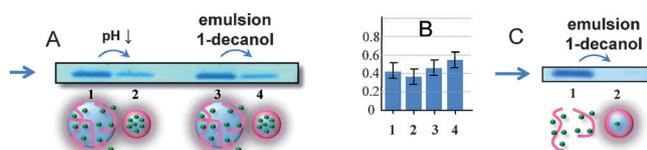


Figure 4. A) SDS-PAGE gel electrophoresis of coacervates prepared in the presence of ribonuclease (lane 1), and of vesicles produced from such coacervates (lane 2; proteinase K was added to digest non-encapsulated ribonuclease). Lanes 3 and 4 correspond to the same processes as above except that the coacervate→vesicle transition was performed by addition of 1-decanol. B) Level of encapsulation within vesicles measured as indicated above, in the case of catalase (1 and 2) and ribonuclease (3 and 4). Vesicles were either produced by decreasing the pH (1 and 3) or by addition of 1-decanol (2 and 4). C) SDS-PAGE gel electrophoresis of 1) a MA dispersion in the presence of ribonuclease and 2) vesicles produced from this dispersion upon addition of 1-decanol (proteinase K was added to digest non-encapsulated ribonuclease). The blue arrow shows the 14 kDa full-length protein. The full gels are shown Figure S4e.

At this point, we wanted to evaluate the efficiency of our encapsulation method in terms of the vesicular volumes. For a dispersion of 5 mL and vesicles with a myristic acid concentration of 10 mg mL^{-1} , the estimated volume of the vesicles is about $10 \mu\text{L}$ (see Section 4d), which is 500 times lower than the total volume. Therefore, proteins encapsulated at a level of 40–60% are concentrated in the $10 \mu\text{L}$ internal volume of the vesicles. In other words, the concentration has been increased by a factor of 200–300 ($500 \times (40\text{--}60\%)$) within the vesicles. Compared to the droplet transfer method, which can achieve protein encapsulation efficiencies of almost 100%,^[7] the present system is slightly less efficient but has the strong advantage of producing a large amount of vesicles in a fast, robust, and highly reproducible manner.

To highlight that precrowding proteins into coacervates is crucial for further high-yielding encapsulation into vesicles, vesicles were produced from a fatty acid dispersion (10 mg mL^{-1} My, My/NaOH/guanidine hydrochloride molar ratio: 1:1:1 (without excess guanidine), pH 9.5; freely dispersed worm-like micelles)^[19] and not from coacervates. In that case, ribonuclease was not precrowded (Figure 4C, below lane 1). After transformation into vesicles by adding 1-decanol and digestion of non-encapsulated proteins by proteinase K, the band representing the full-length protein completely disappeared owing to the low amount of encapsulated proteins (Figure 4C, lane 2).

We then tested whether enzymes encapsulated within vesicles could catalyze reactions inside the vesicles. Coacervates were produced in the presence of glucose oxidase (Gox), glucose, and non-fluorescent resazurin, which should be reduced into fluorescent resorufin upon glucose oxidation^[20] (Figure 5A). We first observed that both glucose and resazurin were dispersed more or less equally within and outside the coacervates (Figure S5a). Consequently, only the enzyme was sequestered within the coacervates. Vesicles were then produced by decreasing the pH value or by addition of 1-decanol. After incubation (see Section S1), epifluorescence images showed yellow dots (Figure 5B) whereas in the blank experiment (Figure 5C, for which vesicles were formed before Gox and substrate addition), black dots lacking fluorescence were observed. This shows that the enzymatic reaction mainly occurred within the vesicles when the enzyme and substrate were initially added in the coacervate dispersion. We also tested a cascade of enzymes using Gox and alkaline phosphatase with glucose-6-phosphate (G6P) as the substrate. In that case, alkaline phosphatase removed the phosphate group of G6P within the vesicles, yielding free glucose, which could further be oxidized by Gox (Figure S5b).

Finally, we made use of the fact that the coacervate→vesicle transition is reversible upon varying the pH to iteratively feed vesicles. Vesicles with encapsulated ribonuclease that were obtained by using the above-mentioned method were fed with a solution of proteinase K, which digested non-encapsulated proteins (see Figure 4A). For comparison with what follows, the electrophoresis gel has been reproduced in Figure 5D (lanes 1 and 2). The pH value was then increased to re-form coacervates (pH 9.5), enabling sequestration of both non-digested ribonuclease and proteinase K within these compartments (Figure 5D). Then, the

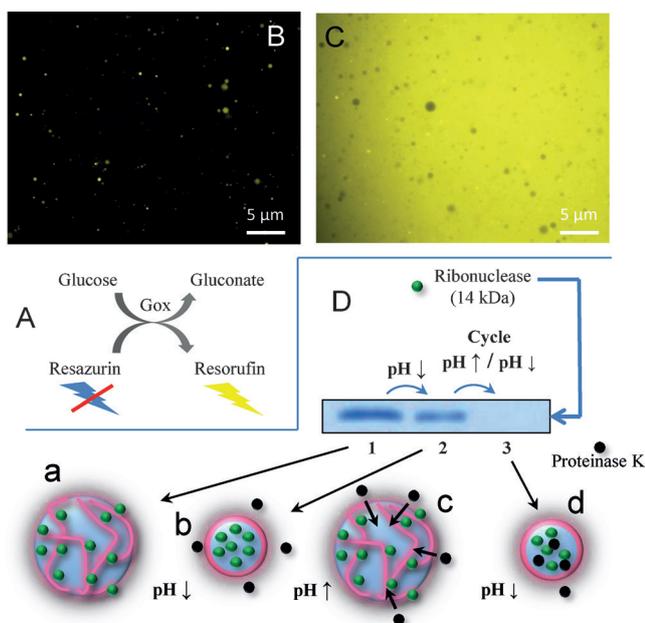


Figure 5. A) Reaction pathway showing the oxidation of glucose into gluconate by glucose oxidase (Gox), accompanied by the reduction of resazurin into resorufin. B) Epifluorescence image of resorufin produced by Gox-enriched vesicles. C) Epifluorescence image of resorufin produced outside vesicles by non-encapsulated Gox. D) SDS-PAGE electrophoresis of ribonuclease in the different states schematically described underneath. From left to right: a) Loading of coacervates with ribonuclease (green dots; lane 1). b) Amount of ribonuclease encapsulated into vesicles (lane 2). c) The pH is increased to re-form coacervates and upload proteinase K. d) The pH is decreased, and both proteinase K and ribonuclease are encapsulated within vesicles, the former being digested (lane 3). The full gel is shown Figure S5 c.

pH value was immediately decreased again to re-form vesicles (pH 8). Gel electrophoresis showed that the band representing the full-length ribonuclease completely disappeared, demonstrating that both proteins were encapsulated within vesicles and that proteinase K digested ribonuclease in these compartments. This process leads to vesicles with encapsulated amino acids and peptides resulting from the digestion of the initially encapsulated protein. It is obvious that enzymatic reactions may also occur in the bulk outside vesicles where the solution contains some non-encapsulated enzymes. However, because the enzyme concentration is 200–300 times higher inside the vesicles than in the external environment, these enzyme-enriched vesicles are highly effective microreactors.

Taken together, we have shown that proteins can be encapsulated within fatty acid vesicles in high yields by a simple and robust method. These findings support a new type of microreactor model based on enzyme-enriched vesicles, which could also provide a novel approach for investigating the construction of primitive and artificial cells. Fatty acid vesicles have long been used as models of protocells,^[1,2,4,16,17,21,22] the primary cells that first appeared on early Earth. Our fatty acid system could also be used as a protocell model, considering that cycles between coacervates and vesicles induced by pH variations and also fusion between coacervates induced by agitation may have occurred

in prebiotic times. The fusion of coacervates would be a plausible explanation for the sharing of ingredients between protocells in the prebiotic period before a mechanism of growing and division of vesicles ensued.^[22,23] Whereas our research has focused on fatty acid coacervates and vesicles thus far, cationic and polymeric systems have also been shown to undergo complex coacervation^[24] and are also known to self-assemble into vesicles.^[8,25] Therefore, these surfactant and polymeric systems could also be used for precrowding biomolecules within coacervates, to further allow their encapsulation inside vesicles upon a coacervate → vesicle transition.

Acknowledgements

We thank T. Michon for a donation of YFP. The confocal and epifluorescence microscopy studies were done at the Bordeaux Imaging Center, a service unit of CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging.

Keywords: coacervates · encapsulation · microreactors · proteins · vesicles

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13475–13479
Angew. Chem. **2016**, *128*, 13673–13677

- [1] C. Fritjof, P. Luigi Luisi, *The Systems View of Life*, Cambridge University Press, New York, **2014**; P. Luigi Luisi, P. Stano, *The minimal cell*, Springer Science, **2011**.
- [2] A. J. Dzieciol, S. Mann, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 79–85; S. Mann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 155–162; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 166–173; U. J. Meierhenrich, J.-J. Filippi, C. Meinert, P. Vierling, J. P. Dworkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3738–3750; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3826–3839; Y. Tu, F. Peng, A. Adawy, Y. Men, L. K. E. A. Abdelmohsen, D. A. Wilson, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2023–2078; P. L. Luisi, C. Chiarabelli, P. Stano, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *22*, v–vii; K. Morigaki, P. Walde, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2007**, *12*, 75–80; P. Stano, P. L. Luisi, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 633–638; D. Segré, D. Ben-Eli, D. W. Deamer, D. Lancet, *Origins Life Evol. Biospheres* **2001**, *31*, 119–145; D. Deamer, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5375–5379.
- [3] T. P. de Souza, A. Fahr, P. L. Luisi, P. Stano, *J. Mol. Evol.* **2014**, *79*, 179–192; P. L. Luisi, P. Stano, T. de Souza, *Origins Life Evol. Biospheres* **2014**, *44*, 313–317; P.-A. Monnard, D. Deamer, *Origins Life Evol. Biospheres* **2001**, *31*, 147–155.
- [4] P. Stano, E. D'Aguzzo, J. Bolz, A. Fahr, P. L. Luisi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13397–13400; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 13639–13642.
- [5] P. Walde, S. Ichikawa, *Biomol. Eng.* **2001**, *18*, 143–177.
- [6] Y. Elani, A. Gee, R. V. Law, O. Ces, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3332–3338; Y. Elani, R. V. Law, O. Ces, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5305; P. Torre, C. D. Keating, S. S. Mansy, *Langmuir* **2014**, *30*, 5695–5699; V. Noireaux, A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17669–17674.
- [7] F. Caschera, V. Noireaux, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *22*, 85–91; V. Noireaux, Y. T. Maeda, A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3473–3480; S. Pautot, B. J. Frisken, D. A. Weitz, *Langmuir* **2003**, *19*, 2870–2879; S. Pautot, B. J. Frisken, D. A. Weitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10718–10721.

- [8] C. Martino, S.-H. Kim, L. Horsfall, A. Abbaspourrad, S. J. Rosser, J. Cooper, D. A. Weitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6416–6420; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6522–6526.
- [9] A. P. Minton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 34–39; D. van Swaay, T. Y. D. Tang, S. Mann, A. de Mello, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8398–8401; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 8518–8521; A. I. Oparin, *Origin of Life*, Dover Pubns, New York, **1953**; S. Koga, D. S. Williams, A. W. Perriman, S. Mann, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 720–724; C. D. Keating, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2114–2124; S. Lindhoud, M. M. A. E. Claessens, *Soft Matter* **2016**, *12*, 408–413; R. J. Ellis, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 597–604; J. M. Rohwer, P. W. Postma, B. N. Kholodenko, H. V. Westerhoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 10547–10552.
- [10] M. Wang, Y. Wang, *Soft Matter* **2014**, *10*, 7909–7919.
- [11] T. Y. D. Tang, C. R. Che Hak, A. J. Thompson, M. K. Kuimova, D. S. Williams, A. W. Perriman, S. Mann, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 527–533.
- [12] K. Shinoda, S. Friberg, *Emulsions and solubilization*, Wiley, New York, **1986**; T. K. Hodgdon, E. W. Kaler, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2007**, *12*, 121–128.
- [13] D. Garenne, L. Navailles, F. Nallet, A. Grélard, E. J. Dufour, J.-P. Douliez, *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *468*, 95–102.
- [14] J.-P. Douliez, B. Houinsou-Houssou, A. L. Fameau, L. Navailles, F. Nallet, A. Grélard, E. J. Dufour, C. Gaillard, *Langmuir* **2016**, *32*, 401–410.
- [15] J. M. Gebicki, M. Hicks, *Nature* **1973**, *243*, 232–234; M. Hicks, J. M. Gebicki, *Chem. Phys. Lipids* **1977**, *20*, 243–252.
- [16] C. L. Apel, D. W. Deamer, M. N. Mautner, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2002**, *1559*, 1–9.
- [17] W. Hargreaves, D. W. Deamer, *Biochemistry* **1978**, *17*, 3759–3768.
- [18] J. Davis, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **1983**, *737*, 117–171.
- [19] J.-P. Douliez, B. Houinsou-Houssou, A.-L. Fameau, B. Novales, C. Gaillard, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *341*, 386–389; A.-L. Fameau, B. Houinsou-Houssou, J. Ventureira, B. Novales, L. Navailles, F. Nallet, J.-P. Douliez, *Langmuir* **2011**, *27*, 4505–4513.
- [20] H. Maeda, S. Matsu-Ura, Y. Yamauchi, H. Ohmori, *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 622–625.
- [21] P. Walde, K. Cosentino, H. Engel, P. Stano, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 848–865; P. Walde, *Origins Life Evol. Biospheres* **2006**, *36*, 109–150; J. W. Szostak, D. P. Bartel, P. L. Luisi, *Nature* **2001**, *409*, 387–390; R. A. Black, M. C. Blosser, B. L. Stottrup, R. Tavakley, D. W. Deamer, S. L. Keller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 13272–13276; S. S. Mansy, J. P. Schrum, M. Krishna-murthy, S. Tobe, D. A. Treco, J. W. Szostak, *Nature* **2008**, *454*, 122–125.
- [22] P. Walde, R. Wick, M. Fresta, A. Mangone, P. L. Luisi, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11649–11654; E. Blöchliger, M. Blocher, P. Walde, P. L. Luisi, *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 10383–10390; P. Stano, P. L. Luisi, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3639–3653; I. A. Chen, R. W. Roberts, J. W. Szostak, *Science* **2004**, *305*, 1474–1476; M. M. Hanczyc, S. M. Fujikawa, J. W. Szostak, *Science* **2003**, *302*, 618–622.
- [23] I. Budin, A. Debnath, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20812–20819; I. A. Chen, J. W. Szostak, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 988–998; T. F. Zhu, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5705–5713; K. Morigaki, P. Walde, M. Misran, B. H. Robinson, *Colloids Surf. A* **2003**, *213*, 37–44.
- [24] S. I. Jenkins, C. M. Collins, M. G. Khaledi, *Langmuir* **2016**, *32*, 2321–2330; M. G. Khaledi, S. I. Jenkins, S. Liang, *Langmuir* **2013**, *29*, 2458–2464.
- [25] L. Chiappisi, H. Yalcinkaya, V. K. Gopalakrishnan, M. Gradzielski, T. Zemb, *Colloid and Polymer Science* **2015**, *293*, 3131–3143; E. Soussan, S. Cassel, M. Blanzat, I. Rico-Lattes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 274–288; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 280–295; R. O. Brito, E. F. Marques, P. Gomes, S. Falcao, O. Soderman, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 18158–18165; D. E. Discher, A. Eisenberg, *Science* **2002**, *297*, 967–973; J. Huang, C. Bonduelle, J. Thévenot, S. Lecommandoux, A. Heise, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 119–122.

Received: July 22, 2016

Published online: September 23, 2016

Supporting Information

Sequestration of Proteins by Fatty Acid Coacervates for Their Encapsulation within Vesicles

*David Garenne, Laure Beven, Laurence Navailles, Frédéric Nallet, Erick J. Dufourc, and Jean-Paul Douliez**

anie_201607117_sm_miscellaneous_information.pdf

Table of contents:

S.I.1: Materials and methods

Samples preparation

UV-visible and fluorescence experimental procedure

Microscopy

Proteins labelling

Quantification of protein encapsulation

Enzymatic reactions

S.I. 2: Transition coacervates → vesicles:

Figure S.I.2. Schematic representation of fatty acid dispersion used.

S.I. 3: Sequestration of biomolecules inside coacervates:

Figure S.I.3a. Sequestration of proteins within coacervates.

Figure S.I.3b. Schematic representation of the phase separation.

Figure S.I.3c. Quantification of the protein sequestration within coacervates.

Figure S.I.3d. Schematic representation showing that enzymes are still functional.

Figure S.I.3e. Phosphatase alkaline and glucose oxidase are still functional.

Figure S.I.3f. Entire gel partially shown figure 2D (main text).

S.I. 4: Encapsulation of pre-crowded proteins within vesicles

Figure S.I. 4a. Encapsulation of YFP (A) and FITC-ribonuclease (B) in vesicles.

Figure S.I. 4b. Schematic representation of the blank experiment.

Figure S.I. 4c. Schematic representation of the digestion of non-encapsulated proteins.

S.I. 4d. Estimation of the vesicular volume.

Figure S.I. 4e. Entire gels partially shown figure shown figure 4 (main text).

S.I. 5: Using enzyme enriched vesicles as microreactors:

Figure S.I. 5a. Both resazurin and glucose are not fully sequestered in coacervates.

Figure S.I. 5b. Cascade of enzymatic reactions within vesicles.

Figure S.I. 5c. Entire gel partially shown figure shown figure 5 (main text).

Additional references

S.I. 1: Materials and methods

Samples preparation

Myristic acid (My, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France, ref: M3128) was massed in a tube and ultra-pure water was added in amounts depending on the desired concentration, typically 10 mg/mL. Then, desired volumes of a 1M stock solution of guanidine hydrochloride (GuHCl, Sigma-Aldrich, ref: G4505) and NaOH were added. Samples were heated to 70°C and vigorously shaken to ensure complete fatty acid dispersion. Coacervates were prepared according to our previous work ¹ by addition of GuHCl in excess (My/NaOH/GuHCl 1/1/2 molar). Sample tubes were again heated to 70°C above the coacervates/micelles transition and vigorously shaken. My is known to transit from elongated micelles to flat bilayers into coacervates at around 21°C ¹. We have shown that the presence of Triton X114 (Sigma-Aldrich, ref: X114) in these systems lowers the transition temperature (unpublished data) and it was then added to a final concentration of 3 mg/mL. It allowed performing some experiments at room temperature, avoiding transitions to occur inside coacervates. Vesicles were then prepared by addition of 15 µL of a 1M stock HCl solution or 50 µL of a 1-decanol emulsion (Sigma-Aldrich, ref: 150584) under vigorous agitation to a 1 mL solution of coacervates. 1-decanol emulsion was prepared by sonication (3 steps of 30s full power separated by steps of 30s rest) of a mixture of this alkanol (50 µL) and 50 µl of a 10mg/ml myristate/GuHCl stock solution with 1.5 mL of water. Nile red (Sigma-Aldrich, ref: 72485) was used at a concentration of 1 mg/mL in ethanol and 2 µL were added to a 1 mL dispersion of coacervates at 10 mg/mL My.

In the case of the reversible transition, production of coacervates from vesicles was achieved by mixing 15 µl of a 1M NaOH solution to a 1 mL vesicle solution under vigorous agitation.

UV-visible and fluorescence experimental procedure

Spectra were recorded on a Xenius XC UV-visible spectrofluorometer (Safas, Monaco). The data were recorded at 25 °C by using a Ministat 125 thermoregulator (Huber, Germany). 1mg/ml stock solutions of lipase (Sigma Aldrich, ref: L3126), protein markers (GE Healthcare life science, UK, ref: 17-0446-01), horse radish peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich ref: P8375), glucose oxidase (Sigma-Aldrich, ref: G7141), phosphatase alkaline (Sigma-Aldrich, ref: P4552), proteinase K (Sigma-Aldrich, ref: p2308), ribonuclease A and catalase were prepared. 50µL of protein solution were added to a 1 ml coacervates solution and incubated for 12 hours at 32°C yielding a complete macroscopic phase separation with the upper phase enriched in fatty acids. Both phases were separated using a Pasteur pipette to prevent any contamination by the other phase. 20 µl of both phases were further diluted in 1 ml of pure water and poured in a 1 mL quartz glass (Hellma). Acquisitions of spectra were done by measuring absorbance from 200 to 400 nm. In the case of fluorescence spectra, enzymatic reactions were carried out as described in the “Enzymatic reaction” section. After phase separation, 50 µl of each phase were diluted in 1 mL of pure water. Emission spectra were recorded from 550 to 800 nm upon excitation at 550 nm in the case of the resorufin and from 490 to 800 nm upon excitation at 480 nm in the case of the fluorescein.

Microscopy

Observations were made at room temperature at 40x magnification using a Nikon Eclipse Ni optical microscope (Nikon, Japan) in the dark field mode equipped with a Nikon Digital Sight Qi1Mc camera allowing digital images to be collected using the NIS Element BR imaging software. A drop of the coacervate or vesicle or emulsion solution (about 20µL) was deposited on the glass slide surface (76x26x1.1 mm, RS France) and covered with a

cover slide (22x22 mm, Menzel-Glaser, Germany). The glass slides were previously cleaned with ethanol and dried. Epifluorescence images were acquired (at 20x magnification) with a Nikon Eclipse 800 microscope equipped with a Coolsnap HQ2 digital camera (Photometrics) using the Metavue 7.7.1 software (Roper Scientific, France). Samples were prepared by mixing 50 μ l of recombinant YFP 2mg/ml stock solution and 2 μ l of Nile red solution to a 1 ml dispersion of coacervates. 100 μ L of a 0.5 mg/mL FITC-labelled catalase and FITC-labelled ribonuclease solution were mixed with a 1 mL solution of coacervates. The samples were then incubated 20 minutes at 30°C and agitated before acquisition. Coacervates to vesicles transition was performed as described previously and the blank experiments were carried out by addition of the same amount of fluorophores after coacervates to vesicles transition occurs. Fluorophores were detected by using excitation wavelength at 550 nm for Nile red and resorufin, 515 nm for YFP and 495 nm for FITC. Emission wavelength used were 650 nm for Nile red, 580 nm for resorufin, 550 nm for YFP and 520 nm for FITC.

Proteins labelling

Catalase (Sigma-Aldrich, ref: C1345) and ribonuclease A (Sigma-Aldrich, ref: R6513) were labelled by using fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC, Sigma-Aldrich, France, ref: F7250). Solutions of catalase and ribonuclease A were prepared at 2 mg/ml in water. The FITC was dissolved at 1 mg/ml in acetone. 50 μ l of FITC solution were added slowly in 5 μ l aliquots while stirring the protein solution (1 mL). The solution was then incubated in the dark for 12 hours at 4°C. The remaining FITC and the labelled proteins were separated through a PD-10 gel-filtration column (GE Healthcare life sciences, UK, ref: 17-0851-01). Quantification of labelled proteins in the sample was determined by measuring the absorbance at 280 nm and 495 nm.

Quantification of protein encapsulation

For encapsulation assay, 50 μ l of catalase or ribonuclease (both prepared at 1 mg/mL) were incubated with 1 ml of coacervates solution. After formation of vesicles by addition of HCl, 5 μ l of a solution of proteinase K (1 mg/mL) were added and the solution was incubated at 37°C for 1 hour under gentle agitation. At the end of the incubation period, proteins were solubilised in SDS-PAGE loading buffer and boiled at 100°C for 2 min before being separated by 10% SDS PAGE. The gels were then washed 3 times 10 minutes with ultrapure water on a horizontal shaker to remove remaining SDS and incubated with the Coomassie solution for 12 hours. After the staining procedure, the Coomassie was removed and the gels were washed 3 times with ultrapure water to decrease the staining of the background. The quantification of proteins was realised by measuring the intensity of the different bands with the ImageJ v1.48 software (NIH, USA).

Enzymatic reactions

Glucose oxidase enzymatic reaction in vesicles was carried out by incubating 50 μ L of a 2 mg/mL solution of glucose oxidase, 10 μ L of a 1M solution of glucose and 10 μ l of a 1mg/mL solution of Resazurin (Sigma-Aldrich, ref: R7017) in 1mL of a coacervate solution. In the case of the second enzymatic reaction using phosphatase alkaline, 2 μ L of a 2 mg/mL phosphatase alkaline solution and 10 μ L of a 1 mg/mL stock solution of Glucose-6-phosphate (Sigma-Aldrich, ref: G7879) instead of Glucose were added. The samples were incubated 5 minutes at 30°C and the coacervates to vesicles transition was done as described above. After 2 hours incubation at 35°C, epifluorescence images were acquired.

To test the activity of HRP in coacervates, 10 μ L of a 1 mg/mL solution of HRP were mixed with 1 mL of a coacervates solution. The sample was incubated 2 hours at 30°C and phases

were separated by centrifugation 15 minutes at 1000g by using a Hereaus Biofuge primo R centrifuge (Thermofischer, Germany). 1 mL of both phases were separated as described above and mixed with 1 μ L of a H₂O₂ stock solution (Sigma-Aldrich, ref: H1009) and 2 μ l of Ampliflu Red 5 mg/ml solution (Sigma-Aldrich, ref: 90101). After 2 hours of incubation at 30°C, the reaction rate of resorufin formation was determined in both phases by fluorescence spectroscopy. Phosphatase alkaline activity in coacervates was tested with the same method. 10 μ L of 1mg/mL phosphatase alkaline solution were mixed with coacervates. The bulk phase was separated by centrifugation at 1000g during 15 minutes. 2 μ L of a Methylfluorescein-phosphate 0.5 mg/mL stock solution (Sigma-Aldrich, ref: M2629) were mixed with each phases and further analysed by fluorescent spectroscopy.

S.I. 2: Transition coacervates → vesicles:

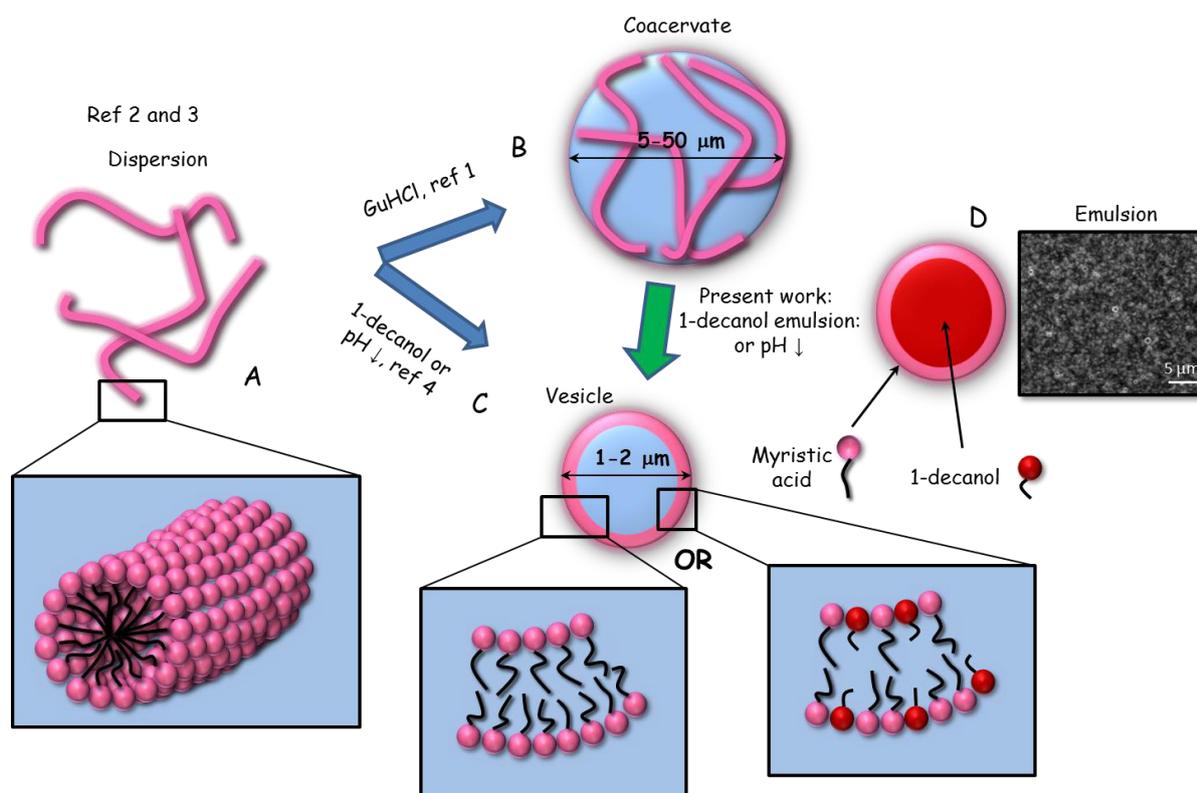


FIGURE S.I.2. Schematic representation of fatty acid dispersions used.

A) Myristic acid dispersion (10 mg/mL myristic acid (My), molar ratio My:NaOH:guanidine hydrochloride: 1:1:1, pH 9.5) forming free elongated micelles (pink noddles, see inset and ref 2,3). B) Formation of coacervates from the above-mentioned My dispersion upon addition of a slight excess of guanidine hydrochloride (GuHCl, see ref 1). The structure has been previously determined 1 and departs from that of cubosomes that are often used as drug delivery carriers 4-8. C) Formation of vesicles from a My dispersion (A) upon addition of HCl (1M) or 1-decanol (pink circle and inset, see ref 9). The schemes are not at scale since coacervates and vesicles exhibit a size of 5-50 and 1-2 μm, respectively. In the present work (green arrow), transitions from coacervates to vesicles are shown to occur by decreasing the pH or upon addition of 1-decanol (previously emulsified, see D: scheme of an emulsion droplet and dark field image of the emulsion) under vigorous agitation without freeze-thaw cycles. Other fatty acids such as palmitic and stearic acids have also been shown to form coacervates 1 but were not used in this study. However, we can reasonably expect that such coacervates would also sequester proteins in the same way.

S.I. 3: Sequestration of biomolecules inside coacervates:

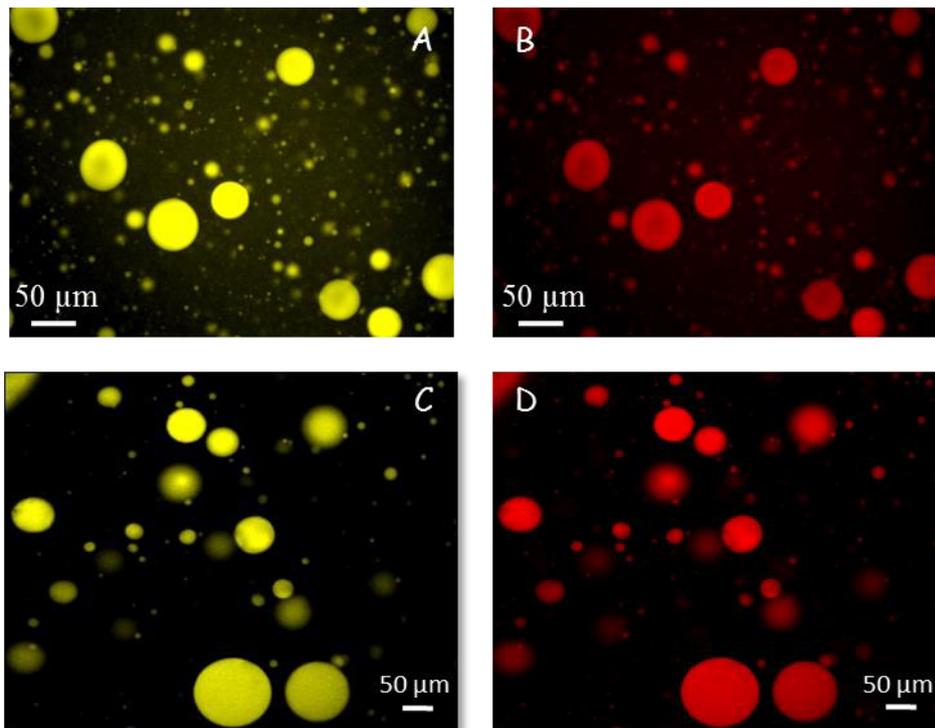


FIGURE S.I.3a. Sequestration of proteins within coacervates. Epifluorescence micrographs of coacervates (10 mg/mL myristic acid (My), molar ratio My:NaOH:guanidine hydrochloride: 1:1:2, pH 9.5) in which both Nile red (B) and FITC-catalase (A) or Nile red (D) and FITC-ribonuclease (C) were added. Images A and C show in false color FITC-labeled droplets that stand for the proteins which perfectly superimpose with those labeled with Nile red (images B and D).

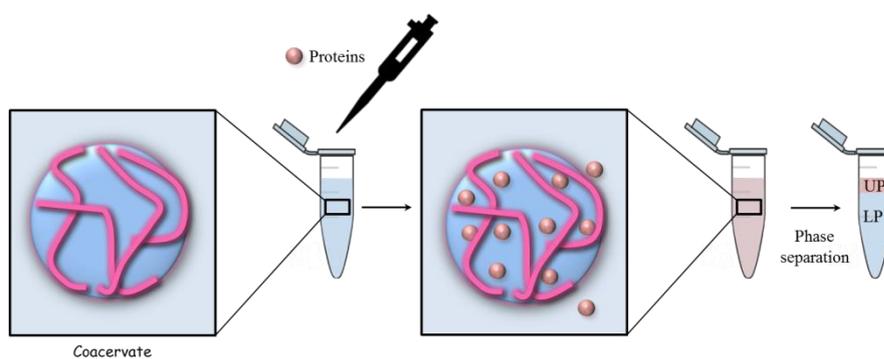


FIGURE S.I.3b. Schematic representation of the phase separation. Coacervates are first produced (left) and proteins are added and spontaneously sequestered within coacervates (middle). Upon resting, coalescence and phase separation occurs (right) allowing recovering both the upper (UP) and lower (LP) phases for further analysis.

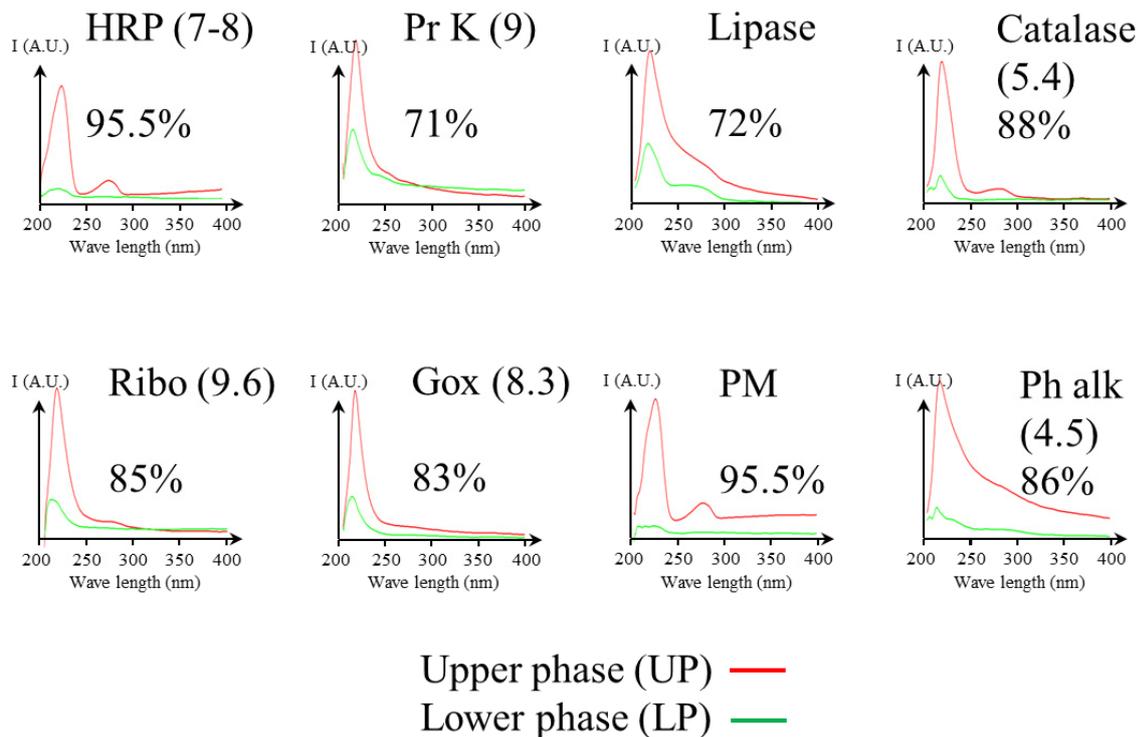


FIGURE S.I.3c. Quantification of the protein sequestration within coacervates.

UV-visible absorption spectra of both the upper and lower phases recovered after phase separation of coacervates (see S.I. 3b) for various proteins: HRP: horse radish peroxidase, Pr K: proteinase K, Ribo: ribonuclease A, Gox: glucose oxidase, PM: protein markers used in gel electrophoresis, which include Phosphorylase (97000 Da), Albumin (66000Da), Ovalbumin (45000Da), Carbonic anhydrase (30000Da), Trypsin inhibitor (20100Da) and Alpha Lactalbumine (14400Da) and finally, Ph alk: phosphatase alkaline. The intensity (Y axis) is given in arbitrary units but was the same for a given protein so that the partitioning of the protein can be determined by the ratio of the main absorption peak (red vs. green); it is indicated on each spectrum as % of sequestered proteins within coacervates. The name of the proteins is indicated on each spectrum together with their isoelectric point between brackets when available in the literature.

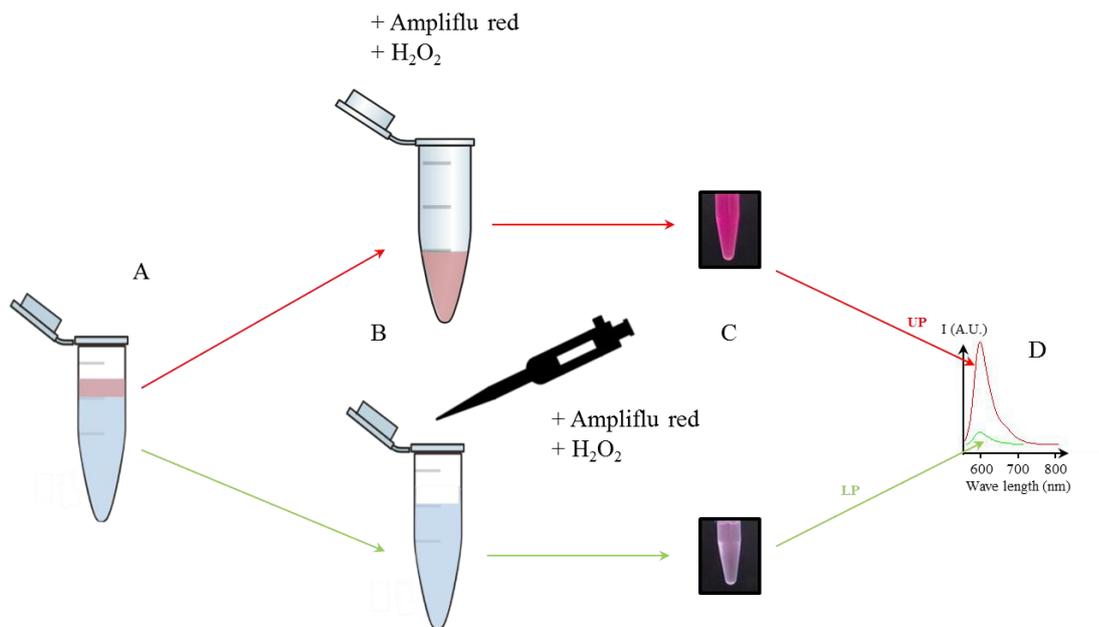


FIGURE S.I.3d. Schematic representation showing that enzymes are still functional.

Coacervates (10 mg/mL myristic acid (My), molar ratio My:NaOH:guanidine hydrochloride: 1:1:2, pH 9.5) were produced in the presence of enzymes (here HRP). After phase separation (A), both the upper and lower phases were recovered (B). The substrates were added in both phases (C) and fluorescence spectra were recorded (D) to determine if (and in which phase) enzymatic reaction occurred. Here, HRP catalyzes the reduction of Ampliflu red (non-fluorescent) into resorufin (fluorescent, Ex/Em = 550/580 nm) in the presence of H_2O_2 . The intense emission at 580 nm observed in the upper phase (UP, red) confirms that HRP is still active and is mainly sequestered within coacervates. Besides, the spectrum of the lower phase (LP, green) is much less intense, about 8 times less. Here again, the intensity is given in arbitrary unit but was the same for both the lower and upper phases.

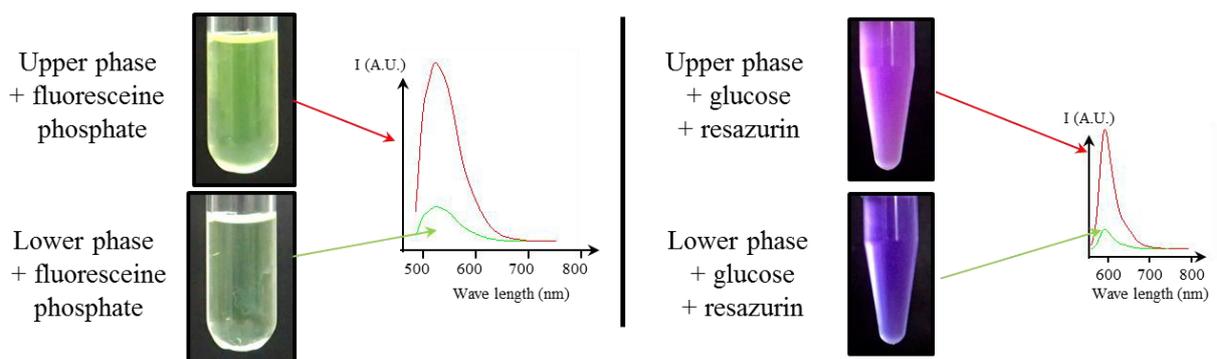


FIGURE S.I.3e. Phosphatase alkaline and glucose oxidase are still functional.

Similar experiments as that reported above were performed using phosphatase alkaline and glucose oxidase (Gox). Phosphatase alkaline catalyzes (left) the hydrolysis of fluorescein phosphate (non-fluorescent) into free fluorescein (fluorescent Ex/Em = 480/510 nm). Both the upper and lower phases were recovered separately and the substrate fluorescein phosphate was added. The intense spectrum observed in the upper phase (red) confirms that phosphatase alkaline was still active and was mainly sequestered within coacervates. Besides, the spectrum of the lower phase (green) was much less intense, about 5 times less.

(Right) Glucose oxidase catalyzes the oxidation of glucose into gluconic acid, producing H_2O_2 and in parallel, the reduction of resazurin (non-fluorescent) into resorufin (Ex/Em = 550/580 nm). Both phases were recovered separately and both substrates glucose and resazurin were added. The intense spectrum observed in the upper phase (red) confirms that Gox was still active and was mainly sequestered within coacervates. Besides, the spectrum of the lower phase (green) was much less intense, about 8 times less. Here again, the intensity is given in arbitrary unit but was the same for both the lower and upper phases.

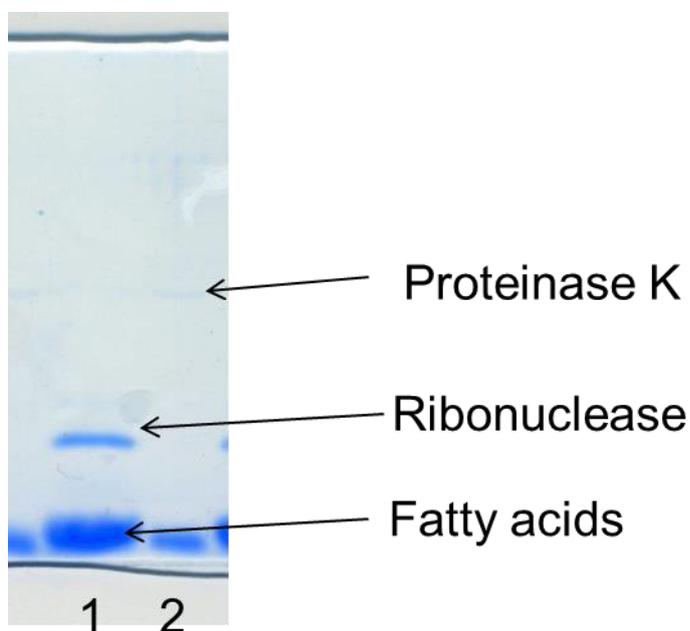


FIGURE S.I.3f. Entire gel partially shown figure 2D (main text).

Entire gel electrophoresis partially shown figure 2D. Legend is the same.

S.I. 4: Encapsulation of pre-crowded proteins within vesicles

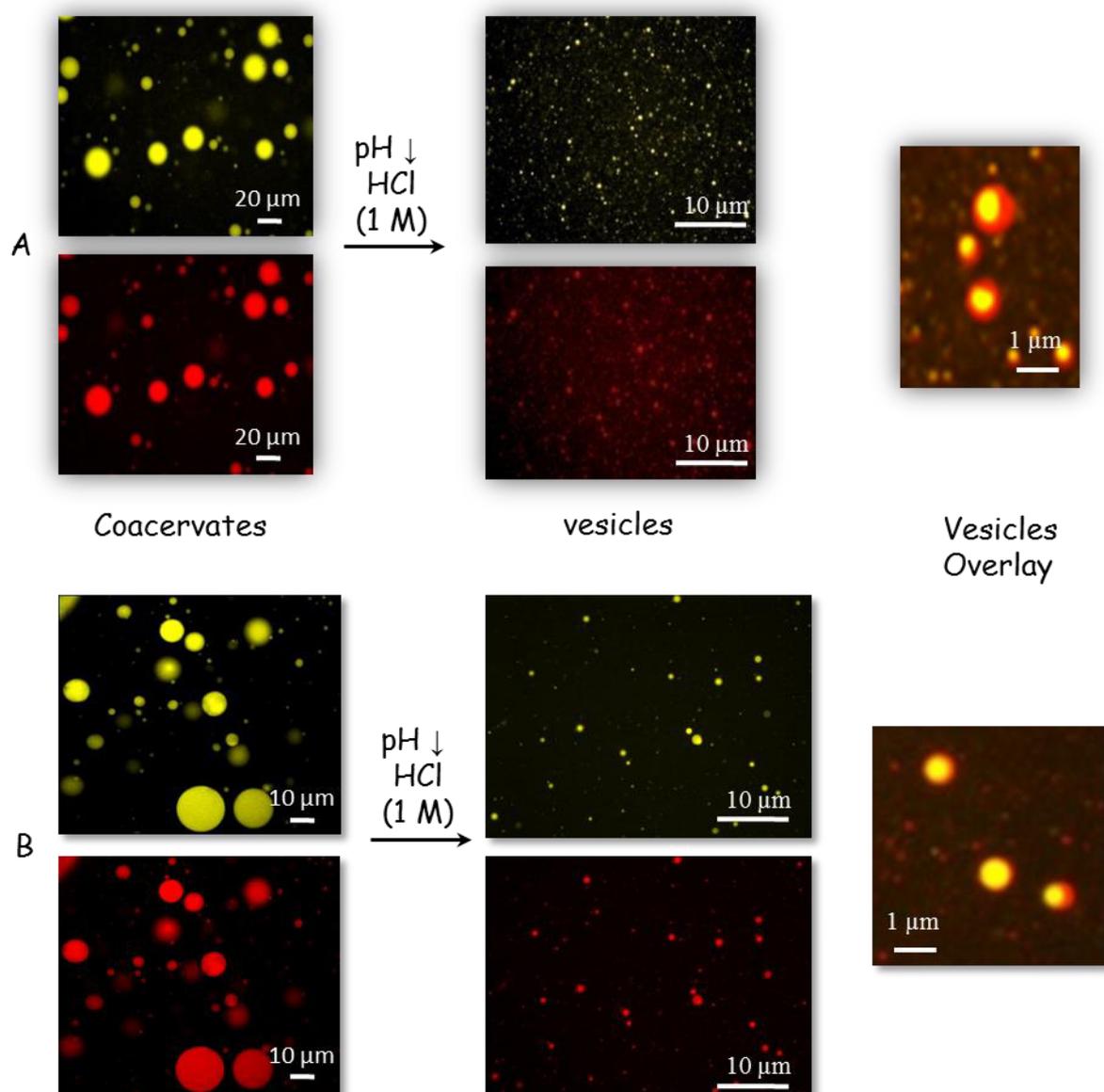


FIGURE S.I. 4a. Encapsulation of YFP (A) and FITC-ribonuclease (B) in vesicles. Epifluorescence images of coacervates (left, 10 mg/mL myristic acid (My), molar ratio My:NaOH:guanidine hydrochloride: 1:1:2, pH 9.5) and vesicles obtained by decreasing the pH (middle, (10 mg/mL myristic acid (My), molar ratio My:NaOH:guanidine hydrochloride: 1:1:2, pH 8). The images in false color with yellow color are those for the proteins whereas images in red are those for Nile red. An overlay of vesicles is also shown (right). Similar images were obtained when the transition coacervate → vesicle was done upon addition of 1-

decanol (not shown). The perfect superposition of red and yellow dots (middle and right) strongly suggests that proteins are encapsulated within vesicles.

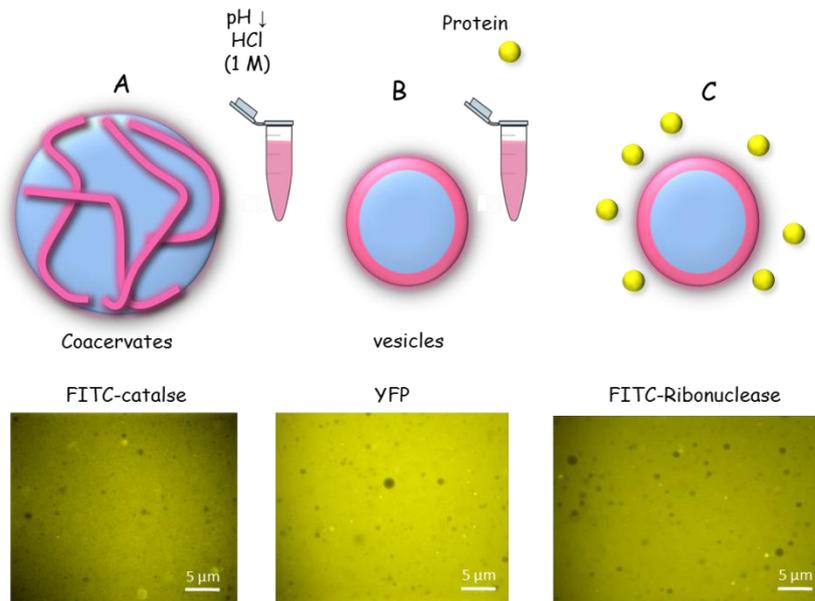


FIGURE S.I. 4b. Schematic representation of the blank experiment. Top: the pH of protein-free coacervates (A, 10 mg/mL myristic acid (My), molar ratio My:NaOH:guanidine hydrochloride: 1:1:2, pH 9.5) was decreased, producing protein free vesicles (B, pH 8). Then, fluorescent proteins (either YFP, FITC-catalase or FITC-ribonuclease) were added, then outside vesicles (C).

Bottom: epifluorescence images obtained for the three proteins showed black dots that stand for 'empty' vesicles surrounded by a yellow fluorescent background.

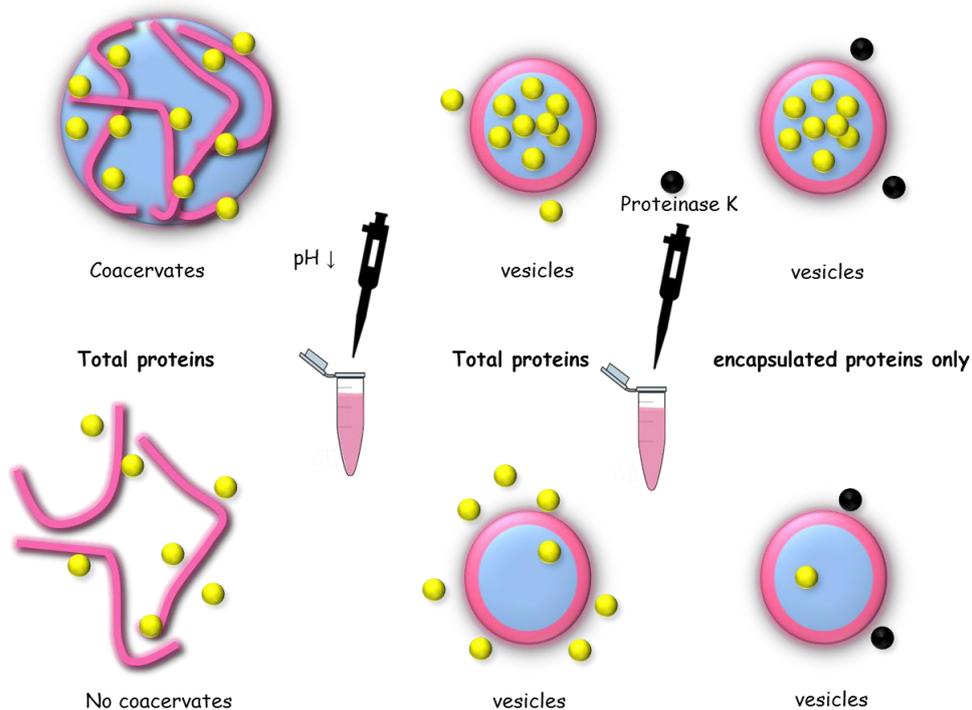


FIGURE S.I. 4c. Schematic representation of the digestion of non-encapsulated proteins.

Top: coacervates (10 mg/mL myristic acid (My), molar ratio My:NaOH:guanidine hydrochloride: 1:1:2, pH 9.5) enriched in proteins (yellow dots) were first produced (left). The mild transition upon decreasing the pH allowed transformation of coacervates into vesicles (pH 8), in which most of the proteins were encapsulated (middle). Proteinase K (black dots), a non-specific protease was then added, allowing digesting non-encapsulated proteins, yielding a solution of ‘*pure*’ vesicles enriched in proteins (right).

Bottom: in the blank experiment, vesicles (pH 8, middle) were produced upon acidification of a *simple* fatty acid dispersion (10 mg/mL myristic acid (My), molar ratio My:NaOH:guanidine hydrochloride: **1:1:1** (without excess guanidine), pH 9.5, see ref ⁹) in which proteins were also added (left). This *simple* dispersion does not form coacervates and thus, does not allow pre-crowding of proteins. Proteinase K digested non-encapsulated proteins yielding a solution of ‘*pure*’ vesicles non-enriched in proteins (right).

S.I. 4d. Estimation of the vesicular volume. To better understand the interest of our method for the encapsulation of proteins and enzymes, it is convenient to estimate the vesicular volume. For a dispersion of 5 mL vesicles at 10 mg/mL myristic acid, this volume can be calculated as follows:

First, one has to estimate the total surface (S_{tot}) of an imaginary unique flat bilayer made of all fatty acids:

$$S_{tot} = n_{fa} * N_{av} * s_{fa} / 2 = s_{fa} * m_{fa} * N_{av} / (2 * M_{fa})$$

Where n_{fa} is the molar number of fatty acids and s_{fa} the surface occupied by a single fatty acid. The factor 2 comes from the fact that fatty acids are embedded in a bilayer. m_{fa} and M_{fa} are the mass of fatty acids used in the dispersion and its molecular weight, respectively, N_{av} being the Avogadro number.

s_{fa} can be roughly estimated to be around 40 \AA^2 .

Now, let 'x' be the number of vesicles in the dispersion, each of them has a surface $s_{ves} = 4\pi R^2$, R being the radius of the vesicles. Then, it comes:

$$S_{tot} = x * 4\pi R^2$$

$$\text{Or } x = S_{tot} / (4\pi R^2)$$

The total vesicular volume, V_{ves} , is then $x * 4\pi R^3 / 3$

$$\text{Then, } V_{ves} = S_{tot} * 4\pi R^3 / (3 * 4\pi R^2) = S_{tot} * R / 3 = R * s_{fa} * m_{fa} * N_{av} / (3 * 2 * M_{fa})$$

For $R = 1 \mu\text{m}$, the volume can then be estimated to be about $10 \mu\text{L}$ what makes a volume 500 times lower than the solution of 5 mL in which these vesicles are dispersed.

$$V_{ves} = 10^{-6} * 40 * 10^{-20} * 0.05 * 6.02 * 10^{23} / (6 * 228) = 8.8 * 10^{-6} \sim 10 \mu\text{L}$$

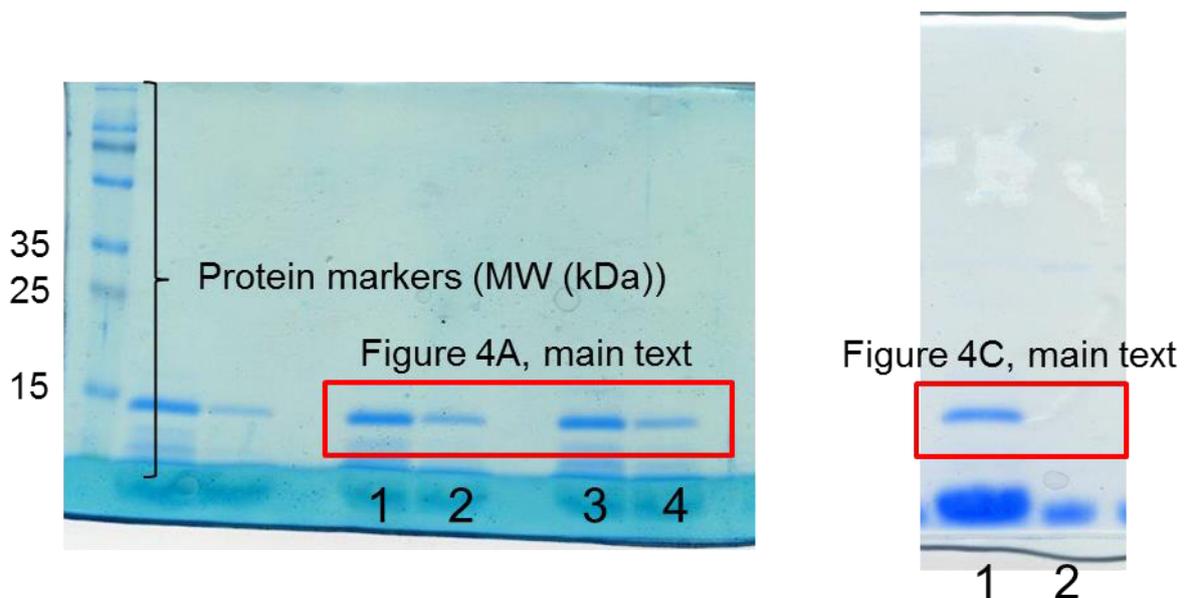


FIGURE S.I.4e. Entire gels partially shown figure 4 (main text).

Entire gel electrophoresis partially shown figure 4. Legend is the same.

S.I. 5: Using enzyme enriched vesicles as microreactors:

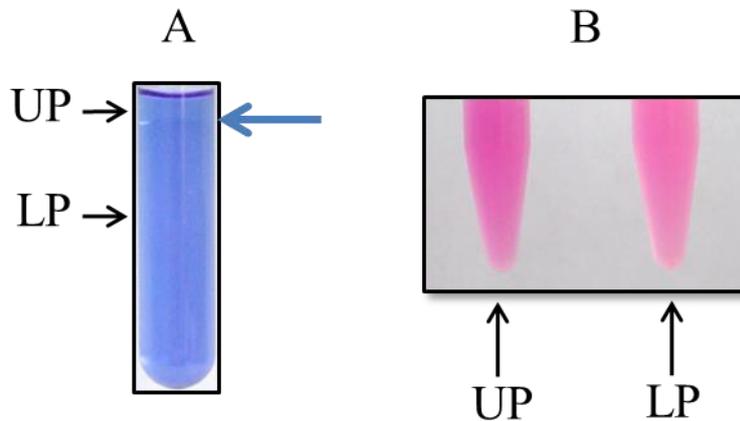


Figure S.I. 5a. Both resazurin and glucose were not fully sequestered in coacervates.

Coacervates (10 mg/mL myristic acid (My), molar ratio My:NaOH:guanidine hydrochloride: 1:1:2, pH 9.5) were produced and resazurin was added. After phase separation, a homogeneous blue color was observed in the sample tube, showing that it was not sequestered in the upper phase (sample tube photo A, the blue arrow guides the eyes to show the phase separation).

B) Glucose was added in a similar coacervate dispersion and both phases were recovered after phase separation, then both Gox and resazurin were added in each phase. After reaction, both phases were pink (sample tubes photo B) showing that resazurin was transformed into resorufin in both phases, and then, that glucose was more or less equally present in both phases.

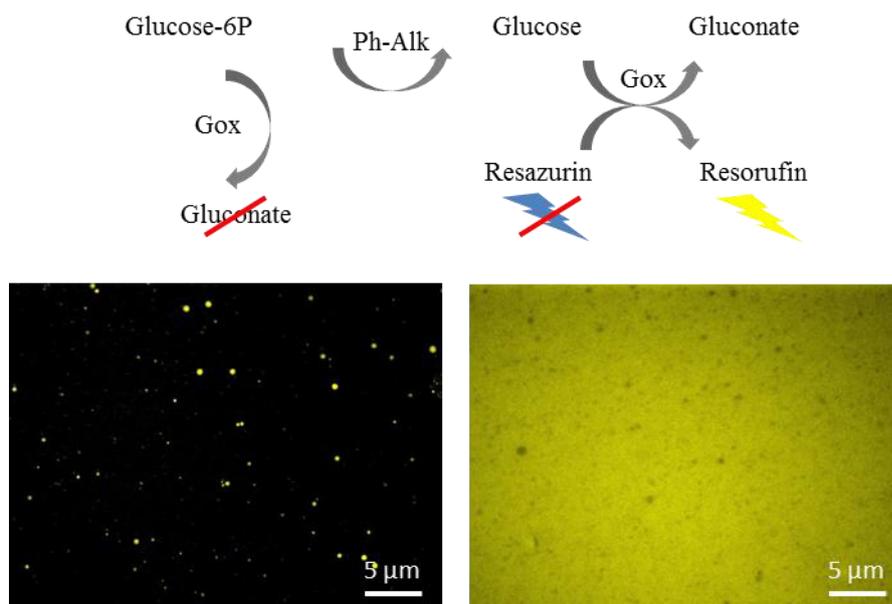


Figure S.I. 5b. Cascade of enzymatic reactions within vesicles. Top: reaction pathway showing that glucose 6 phosphate is not oxidized into gluconate in the presence of glucose oxidase (Gox, left). Phosphatase alkaline (Ph alk) transforms glucose 6P into glucose that can now be oxidized by Gox, accompanied by the reduction of resazurin into resorufin (right). Bottom: Epifluorescence images of vesicles (pH 8) produced upon acidification of coacervates (10 mg/mL myristic acid (My), molar ratio My:NaOH:guanidine hydrochloride: 1:1:2, pH 9.5) containing Gox, phosphatase alkaline, glucose-6-phosphate and resazurin (left, see S.I. 1). Right: in the blank experiment, vesicles were first produced and Gox, phosphatase alkaline, glucose-6-phosphate and resazurin were further added, then outside vesicles.



FIGURE S.I.5c. Entire gel shown figure 5 (main text).

Entire gel electrophoresis partially shown figure 5. Legend is the same.

Additional references:

1. D. Garenne, L. Navailles, F. Nallet, A. Grélard, E. J. Dufourc and J.-P. Douliez, *J. Coll. Int. Sci.*, 2016, **468**, 95-102.
2. J.-P. Douliez, B. Houinsou-Houssou, A.-L. Fameau, B. Novales and C. Gaillard, *J. Coll. Int. Sci.*, 2010, **341**, 386-389.
3. A.-L. Fameau, B. Houinsou-Houssou, J. Ventureira, B. Novales, L. Navailles, F. Nallet and J.-P. Douliez, *Langmuir*, 2011, **27**, 4505-4513.
4. K. Suga, D. Kondo, Y. Otsuka, Y. Okamoto and H. Umakoshi, *Langmuir*, 2016, **32**, 7606-7612.
5. M. Younus, R. N. Prentice, A. N. Clarkson, B. J. Boyd and S. B. Rizwan, *Langmuir*, 2016, **32**, 8942-8950.
6. Gopal Garg, Shailendra Saraf and Swarnlata Saraf, *Biol. Pharm. Bull.*, 2007, **30**, 350-353.
7. Z. Karami and M. Hamidi, *Drug Discovery Today*, 2016, **21**, 789-801.
8. P. T. Spicer, *Curr. Op. Coll. Inter. Sci.*, 2005, **10**, 274-279.
9. J.-P. Douliez, B. Houinsou Houssou, A. L. Fameau, L. Navailles, F. Nallet, A. Grélard, E. J. Dufourc and C. Gaillard, *Langmuir*, 2016, **32**, 401-410.

2) Résumé de la publication

L'objectif de ce projet est de mettre en évidence une transition entre le système de coacervats et le système de vésicules décrit précédemment,⁷⁸ afin de séquestrer préalablement les biomolécules dans les coacervats puis d'effectuer la transition en vésicules pour encapsuler ces biomolécules dans un compartiment fermé. Cette publication a permis de mettre en évidence plusieurs points.

Le premier point concerne la transition des coacervats en vésicules. Ce phénomène de transition n'avait jamais été décrit avant ces travaux et s'effectue en diminuant le pH de la solution de coacervats à une valeur comprise entre 7.5 et 8.5 ou en présence de décanol (Figure 26). Les acides gras initialement structurés en micelles forment alors des bicouches. Cette transition permet la production de vésicules polydisperses de diamètre inférieur à 5 µm. Ce phénomène est réversible par l'augmentation du pH et irréversible en présence de décanol. Il est ainsi possible réaliser des cycles de transitions entre coacervats et vésicules en faisant varier le pH de la solution.

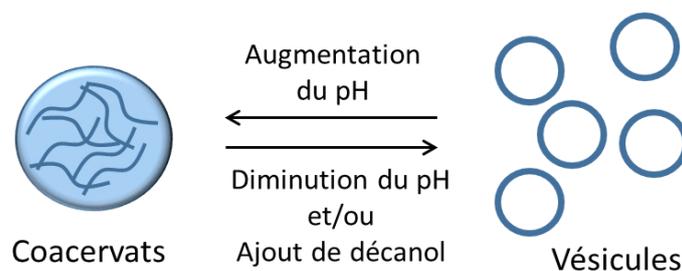


Figure 26 : Conditions de transition des coacervats en vésicules.

La diminution de pH et/ou l'ajout de décanol, entraîne la formation de vésicules à partir d'une solution de coacervats. Cette transition est réversible en augmentant le pH et permet l'accomplissement de plusieurs cycles de transition.

Le second point concerne la séquestration de protéines et d'enzymes dans les coacervats. Les observations aux microscopes à épifluorescence et confocal de protéines auto-fluorescentes ou de protéines sur lesquelles nous avons greffé un fluorochrome en présence de coacervats montre que ces protéines sont localisées au niveau des coacervats. La partition des protéines dans les coacervats se situe entre 70 et 95 % de la quantité totale selon les protéines. Les activités de la glucose oxydase, la phosphatase alcaline ainsi que la horse radish peroxydase montrent que les activités enzymatiques sont conservées dans les coacervats après des temps d'incubation de quelques minutes.

La dernière étape de ce projet était de déterminer si les protéines séquestrées dans les coacervats étaient retrouvées dans les vésicules. La première approche par fluorescence nous a permis d'observer que la Yellow Fluorescent Protein (YFP) initialement présente dans les coacervats était localisée dans les vésicules après avoir effectué la transition. Afin de quantifier le taux de protéines encapsulées nous avons utilisé une méthode de digestion par la protéinase K. La protéinase K est une enzyme à large spectre hydrolysant les liaisons peptidiques adjacentes des groupements carboxyliques des acides aminés aromatiques et aliphatiques. Ajoutée dans une suspension de vésicules, cette enzyme ne peut diffuser à travers les membranes imperméables des acides gras. Ainsi, son activité hydrolytique ne s'exerce que sur les protéines extérieures aux vésicules. Après séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide du mélange de vésicules en présence de protéinase K, nous avons pu quantifier la fraction de protéines non digérées et la rapporter à la fraction totale incubée au départ. Les résultats montrent que la ribonucléase et la catalase sont encapsulées à hauteur de 40 à 60 % de la fraction protéique totale dans les vésicules. Il est important de noter que le volume des vésicules étant très faible (2 μ L pour 1 ml de solution), le facteur de concentration des protéines à l'intérieur des vésicules est de 500. Ces résultats ont permis la mise en évidence d'un système d'encapsulation basé sur la séquestration préalable des molécules dans des coacervats (Figure 27).

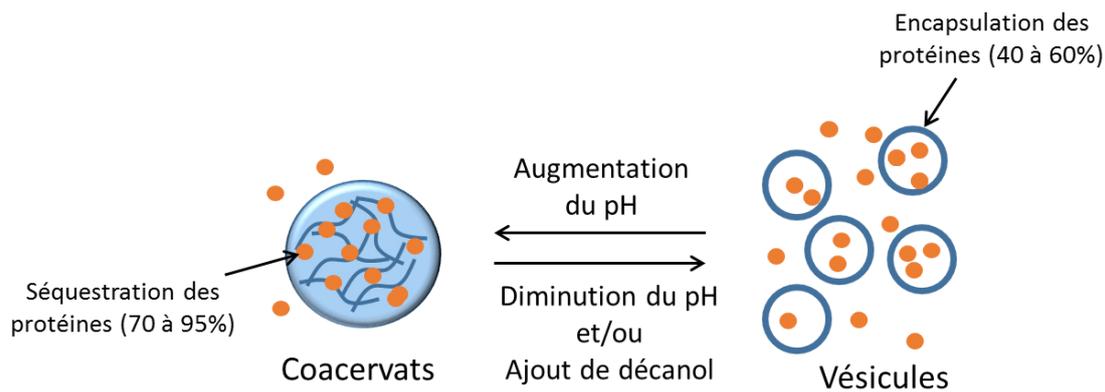


Figure 27 : Encapsulation des protéines dans les vésicules.

Les protéines que nous avons testées sont séquestrées dans les coacervats à hauteur de 70 à 95% de la quantité de protéine totale. Lors de la transition de phase, nous avons montré pour la catalase et la ribonucléase que les taux d'encapsulation dans les vésicules étaient de 40 à 60% de la quantité de protéines initiale incubée dans les coacervats.

L'encapsulation d'enzymes en présence de leur substrat nous a permis de mettre en évidence des réactions enzymatiques à l'intérieur des vésicules. La glucose oxydase est incubée en présence de coacervats et des substrats avant d'effectuer la transition en vésicules. Après une heure à 37°C, les vésicules observées-au microscope à épifluorescence exhibent un signal de fluorescence lié à l'activité de l'enzyme. Seuls les vésicules émettent une fluorescence, ce qui suggère que la réaction s'effectue à l'intérieur des vésicules. Les contrôles sans enzymes et sans substrats n'exhibent pas de signal de fluorescence à l'intérieur des vésicules. Nous avons également réalisé une chaîne réactionnelle dans les vésicules impliquant deux enzymes : la glucose oxydase et la phosphatase alcaline. Le glucose-6-phosphate est transformé par la phosphatase alcaline en glucose lui-même transformé en acide gluconique par la glucose oxydase. Cette réaction effectuée en présence de résazurine permet l'émission d'un signal de fluorescence localisé dans les vésicules. Les expériences témoins sans l'une ou l'autre des deux enzymes ou en absence de substrat ne montrent pas de signal de fluorescence. L'encapsulation de ces enzymes dans des vésicules après transition de coacervats à vésicules n'entrave donc pas l'activité enzymatique.

3) Résultats complémentaires

Dans cette étude, nous avons montré que les coacervats étaient capables de former des vésicules en diminuant le pH à des valeurs comprises entre 7.5 et 8.5. Cette transition est aussi possible en utilisant une émulsion de décanol, ce qui permet d'observer des vésicules à un pH plus élevé comme cela avait été montré précédemment⁷⁸. La figure 28 montre la gamme de pH dans laquelle les coacervats ainsi que les vésicules se forment.

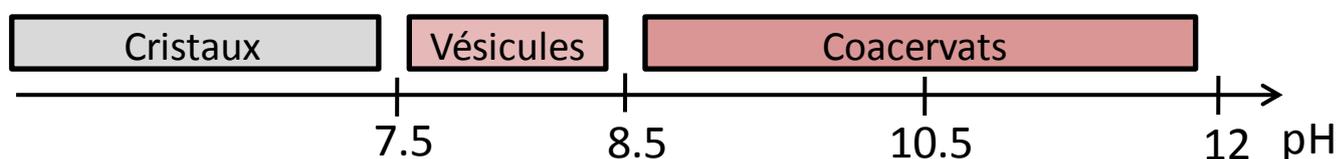


Figure 28 : Rôle du pH sur la structuration des acides gras en présence de guanidine.

Cette frise représente les valeurs de pH à partir desquels le système d'acides gras est capable de former des coacervats, des vésicules ou des cristaux.

A/ Séquestration de biomolécules dans les coacervats

Après avoir mis en évidence la séquestration de protéines dans les coacervats, nous avons mesuré la présence de nucléotides et de cofacteurs à l'intérieur des coacervats. Nous avons incubé les molécules à tester dans une solution de coacervats. Après séparation de phases, la mesure de l'absorbance à 260 nm dans les deux phases a été effectuée afin de quantifier la localisation des biomolécules dans chacune des phases.

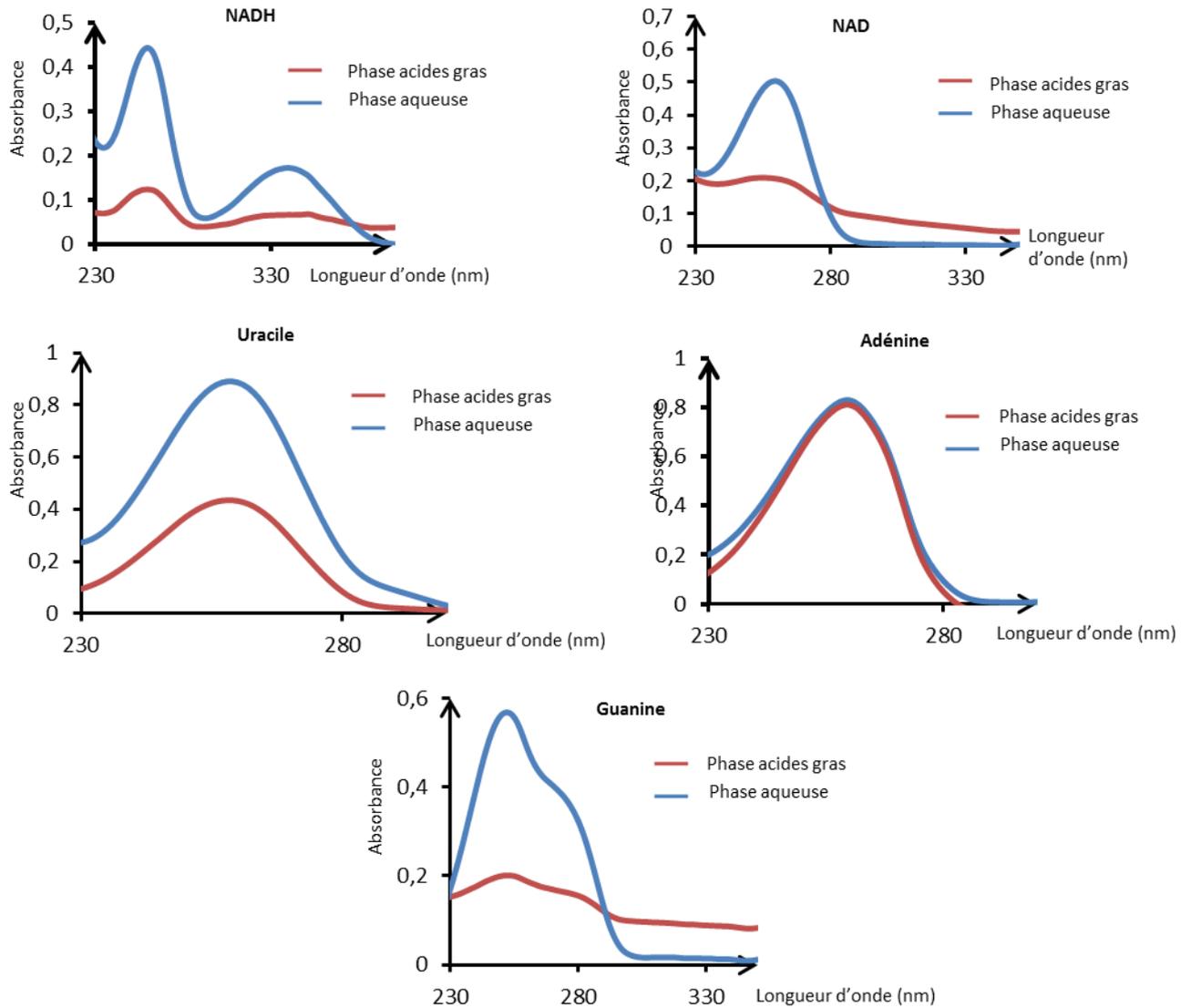


Figure 29 : Séquestration de biomolécules dans les coacervats.

Mesure de l'absorbance à 260 nm de différentes molécules dans la phase d'acides gras ainsi que dans la phase aqueuse.

Les résultats de la figure 29 montrent que contrairement aux protéines, les nucléotides ainsi que les cofacteurs testés sont partitionnés majoritairement dans la phase aqueuse. Ce phénomène s'explique très vraisemblablement par la charge négative de ces molécules qui, comme nous l'avons montré avec les sondes chargées négativement, entraîne une exclusion de ces molécules en dehors des coacervats.

B/ Influence du pH sur la séquestration des protéines dans les coacervats

Les données présentées dans la publication montrent que les protéines testées sont séquestrées dans les coacervats à hauteur de 70 à 95% de la quantité totale de protéines ajoutée. D'autre part, les coacervats sont formés dans une gamme de pH large, supérieur à pH 8.5. Au sein de cette gamme, nous avons également observé par microscopie à épifluorescence que la séquestration de la GFP à l'intérieur des coacervats était dépendante du pH (Figure 30).

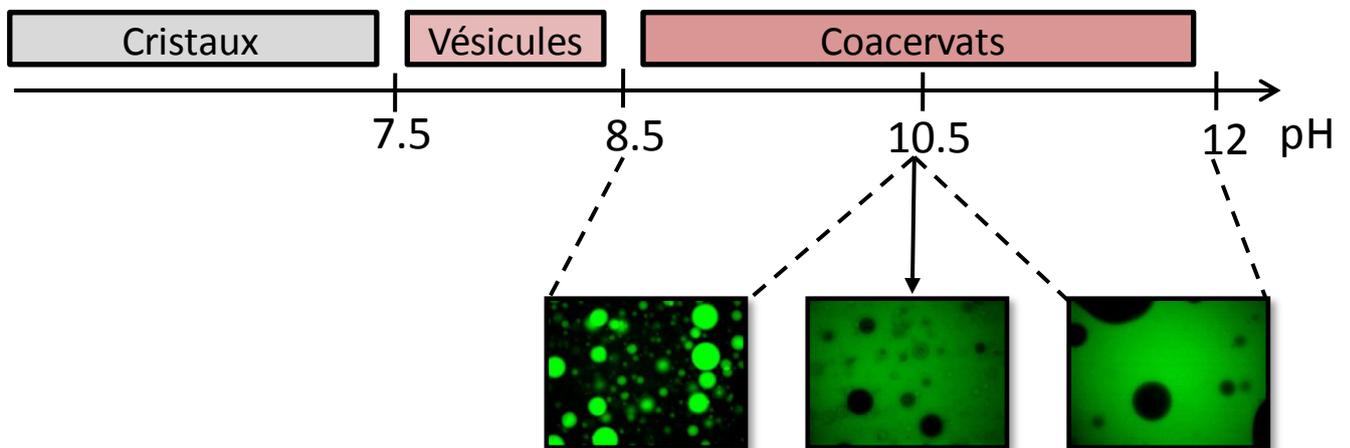


Figure 30 : Rôle du pH dans la séquestration de la GFP dans les coacervats.

Image de microscopie à épifluorescence de la localisation de la GFP. La séquestration de la GFP dans les coacervats est dépendante de la valeur du pH. A partir d'un pH de 10.5, la GFP est exclue des coacervats.

A partir d'une valeur de pH de 10.5, la GFP initialement séquestrée est exclue des coacervats. Cette valeur de pH correspond au pKa de la chaîne latérale des lysines. L'augmentation du pH entraîne la déprotonation des fonctions amines libres des chaînes latérales des lysines et ainsi aboutit à une perte de la charge positive de ces acides aminés. Ainsi, l'absence des charges positives des lysines présentes pourrait constituer une explication possible pour l'exclusion de la GFP hors des coacervats à cette valeur de pH.

C/ Effet détergent des acides gras sur la dénaturation des enzymes dans les coacervats

La glucose oxydase, la horse radish peroxydase ainsi que la phosphatase alcaline conservent leurs activités après 5 minutes de séquestration dans les coacervats. Cependant, Il a été montré que les acides gras ont un effet détergent sous forme de micelles pouvant dénaturer les enzymes et en particulier les complexes enzymatiques (Bull et Breese, 1967; Swarts *et al.*, 1991). Ainsi, nous avons testé l'activité de deux enzymes multimériques, la glucose oxydase dimérique et la lactate déshydrogénase tétramérique, au cours du temps dans les coacervats.

a) Mesure de l'activité de la glucose oxydase

L'activité de la glucose oxydase est mesurée par un test de fluorescence. Ici, l'enzyme est incubée dans une solution de coacervats pendant 1 heure, 5 heures et 20 heures. Une fois ces temps d'incubation effectués, le glucose ainsi que la résazurine sont ajoutés à la solution de coacervats contenant l'enzyme afin d'effectuer la réaction. La figure 31 montre que le signal de fluorescence au cours du temps augmente aussi bien après 1 heure, 5 heures et 20 heures, ce qui signifie que l'enzyme semble conserver la totalité de son activité même après plusieurs heures d'incubation dans les coacervats.

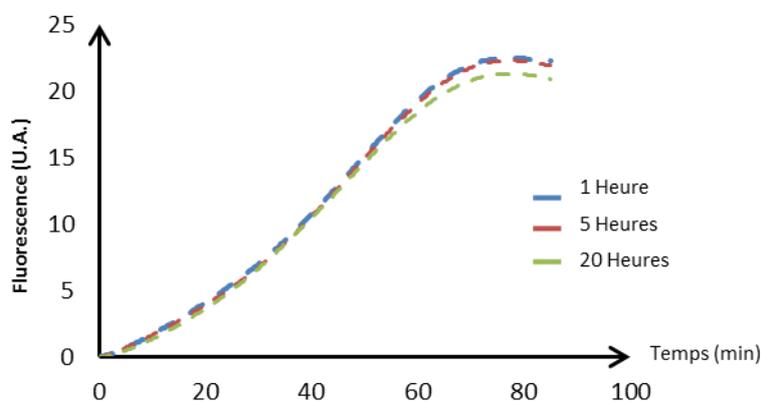


Figure 31 : Mesure de l'activité de la glucose oxydase après incubation dans les coacervats.

Fluorescence générée au cours du temps liée à l'activité de la glucose oxydase dans les coacervats à pH 9.5. Dans les trois cas, le signal de fluorescence obtenu au cours du temps reste similaire.

b) Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase est une enzyme tétramérique qui catalyse la transformation réversible du pyruvate en lactate en présence de NADH. Ce dernier est alors transformé en NAD lors de la réaction. Le NADH absorbe à 340 nm ce qui n'est pas le cas du NAD. Ainsi, l'activité de la lactate déshydrogénase peut être suivie au cours du temps en mesurant la consommation de NADH par mesure de l'absorbance à 340 nm (Figure 32).

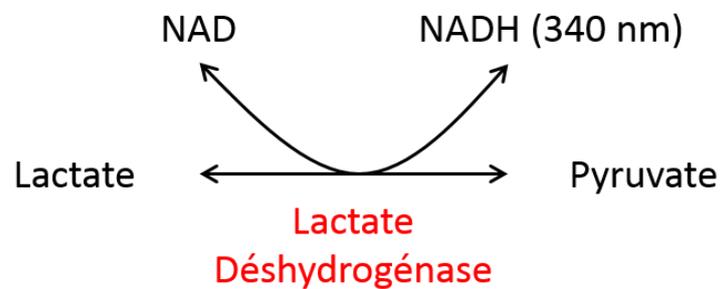


Figure 32 : Activité enzymatique de la lactate déshydrogénase.

La lactate déshydrogénase catalyse la transformation réversible du lactate en pyruvate. Cette enzyme est dépendante du NAD ou du NADH en fonction du sens réactionnel.

L'enzyme est incubée dans les coacervats pendant 5 minutes avant d'ajouter le pyruvate et le NADH. La figure 33 montre que la consommation de NADH en bleu est plus importante dans le tampon (0.7 U.A. en 10 minutes) que dans les coacervats (0.5 U.A. en 10 minutes) au cours du temps. Ces résultats indiquent que l'activité de l'enzyme dans les coacervats est donc diminuée au cours de l'incubation suggérant un effet des coacervats sur la conformation et donc l'activité de l'enzyme.

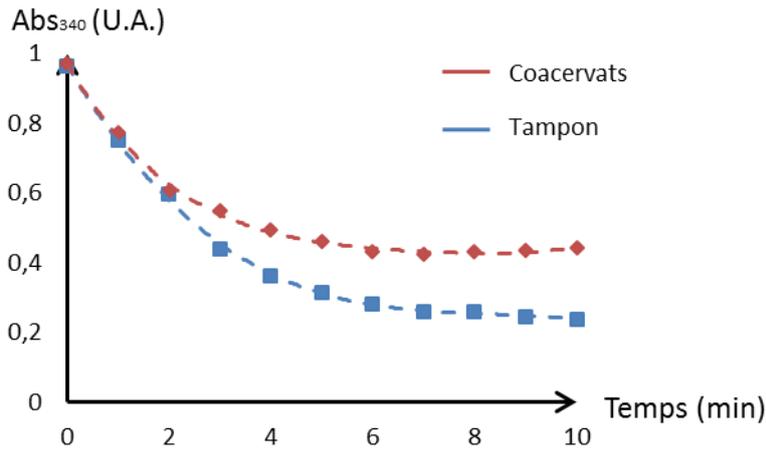


Figure 33 : Mesure de l'activité de la Lactate déshydrogénase après incubation dans les coacervats.

Mesure de l'absorbance à 340 nm liée à l'activité de la lactate déshydrogénase dans un tampon ou dans les coacervats à une valeur de pH de 9.5 dans les deux cas.

D/ Paramètres cinétiques de la glucose oxydase dans les vésicules

Nous avons mis en évidence des réactions enzymatiques comme celle de la glucose oxydase à l'intérieur des vésicules en encapsulant l'ensemble des intervenants de la réaction. Le facteur de concentration des protéines dans les vésicules étant très important (500 fois), nous avons voulu mesurer la différence de vitesse liée à l'encapsulation des enzymes dans les vésicules. De la même façon que pour l'expérience précédente, nous avons mesuré l'activité de la glucose oxydase par la mesure de la fluorescence au cours du temps dans le cas (i) où tous les intervenants de la réaction sont à l'intérieur des vésicules et dans le cas où (ii) tous les intervenants de la réaction sont à l'extérieur des vésicules. Pour cela, dans le premier cas nous avons incubé l'enzyme ainsi que le glucose et la résazurine avec une solution de coacervats avant d'effectuer la transition en vésicules. Dans le second cas, nous avons d'abord transformé les coacervats en vésicules avant d'incuber l'enzyme, le glucose et la résazurine.

Nous avons effectué une courbe de Michaelis-Menten qui détermine la vitesse de réaction en fonction de la quantité de substrats. Nous avons mesuré la vitesse de réaction de l'enzyme au

cours du temps pour différentes concentrations en glucose. Pour chacune des courbes obtenues, la valeur de la pente correspondant à la vitesse initiale de la réaction est calculée. Ainsi pour chacune des concentrations en glucose, une valeur de pente est obtenue. La courbe représentant les valeurs de pentes en fonction de la concentration en glucose (Michaelis-Menten) permet de déterminer deux paramètres cinétiques de la réaction : le K_m (constante de Michaelis) et la V_{max} (Vitesse maximale). La valeur de K_m détermine l'affinité d'une enzyme pour son substrat et donc la vitesse avec laquelle une enzyme est capable de le métaboliser. La figure 34 montre que la vitesse de réaction de l'enzyme est plus importante lorsqu'elle est encapsulée (en bleu) à l'intérieur des vésicules que lorsque l'enzyme est à l'extérieur des vésicules (en rouge). Les valeurs de K_m déterminées par la valeur en x de $\frac{1}{2} * V_{max}$ semblent être proches de 10 et de 30 à l'intérieur et à l'extérieur du compartiment respectivement.

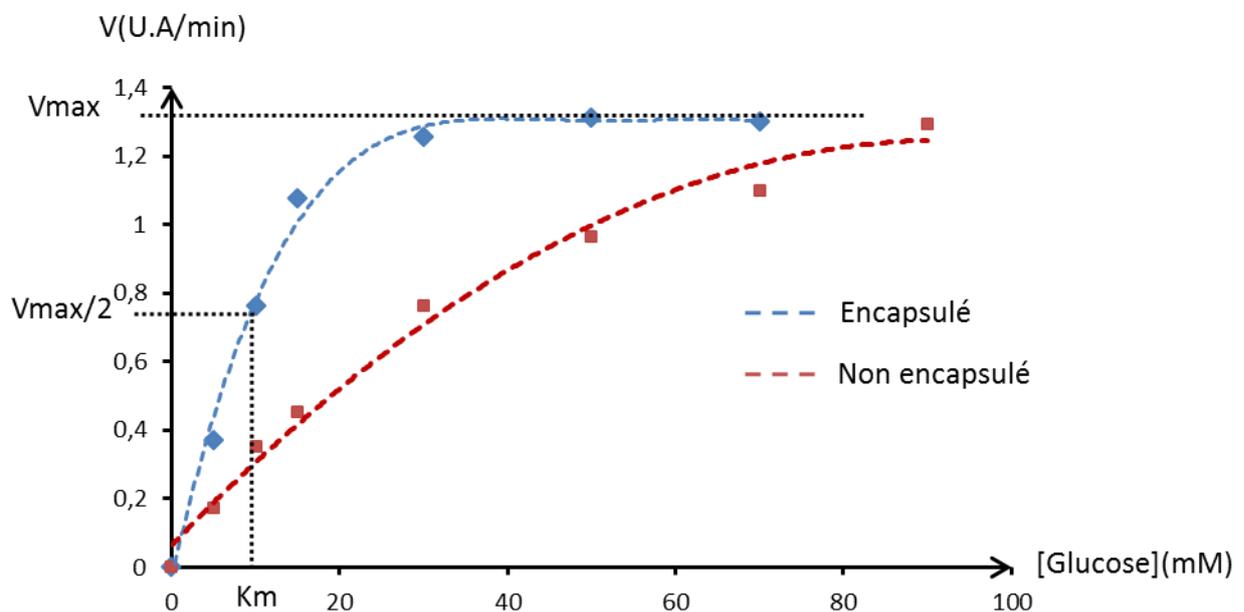


Figure 34 : Cinétique de la glucose oxydase encapsulée et non encapsulée dans les vésicules.

La représentation de Michaelis-Menten montre la courbe des valeurs de vitesses initiales pour chacune des concentrations en substrats à des valeurs de pH de 7.5. La glucose oxydase transforme plus rapidement le substrat lorsqu'elle est encapsulée dans les vésicules (en bleu) que lorsqu'elle ne l'est pas (en rouge).

Des représentations linéaires comme celles de Lineweaver-Burk permettent d'augmenter la précision des valeurs de K_m et de V_{max} obtenues par l'équation de Michaelis-Menten. La

représentation de Lineweaver-Burk est effectuée en reportant les valeurs inverses de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration en substrats. Cette représentation entraîne la linéarisation de ces courbes ce qui permet d'augmenter la précision des valeurs de K_m et de V_{max} obtenues. La valeur de K_m peut être déterminée de la façon suivante : la valeur donnée lorsque la droite coupe l'axe des abscisses est égale à $-1/K_m$. Ainsi, les valeurs de K_m sont de 9 et 36 à l'intérieur et à l'extérieur du compartiment respectivement. Ces résultats montrent que la vitesse de réaction à l'intérieur du compartiment est 4 fois supérieure à celle obtenue à l'extérieur du compartiment (Figure 35).

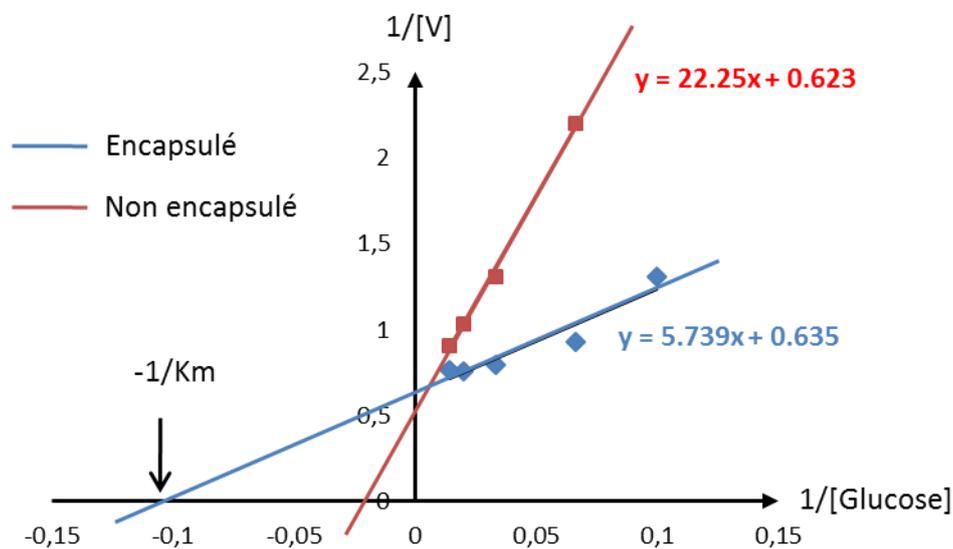


Figure 35 : Cinétique de la glucose oxydase encapsulée ou non encapsulée dans les vésicules.

La représentation de Lineweaver-Burk permet la linéarisation de la représentation de Michaelis-Menten. Cette représentation permet d'obtenir des valeurs plus précises de K_m et de V_{max} . Dans notre cas, la valeur de K_m lorsque la glucose oxydase est encapsulée est de 9 et de 36 lorsque la glucose oxydase n'est pas encapsulée. Ces résultats montrent que lorsque la glucose oxydase est encapsulée dans les vésicules la réaction enzymatique est 4 fois plus importante. (n=3)

E/ Influence de la taille des vésicules sur les taux d'encapsulation de protéines

Lors de la transition des coacervats en vésicules en présence d'HCl, nous avons observé que pour un volume plus faible en HCl ajouté, certaines vésicules formées sont de taille supérieure

et peuvent atteindre 10 μm (Figure 36). Nous avons voulu déterminer s'il existait une corrélation entre la taille des vésicules et l'encapsulation de biomolécules. Pour cela, nous avons incubé indépendamment la ribonucléase et la catalase dans une solution de coacervats. Nous avons effectué la transition en vésicules en utilisant deux volumes différents d'HCl (la concentration finale d'HCl étant la même dans les deux conditions). Nous avons ensuite calculé les taux d'encapsulation de la ribonucléase et de la catalase par la méthode de digestion par la protéinase K. Parallèlement, la suspension est observée en microscopie à fond noir afin d'évaluer la taille des vésicules formées. Les résultats montrent que l'utilisation d'un volume plus faible d'HCl permet de meilleurs taux d'encapsulation (Figure 36). Ceci suggère que la taille des vésicules formées lors de la transition influence les taux d'encapsulation de la catalase ainsi que de la ribonucléase.

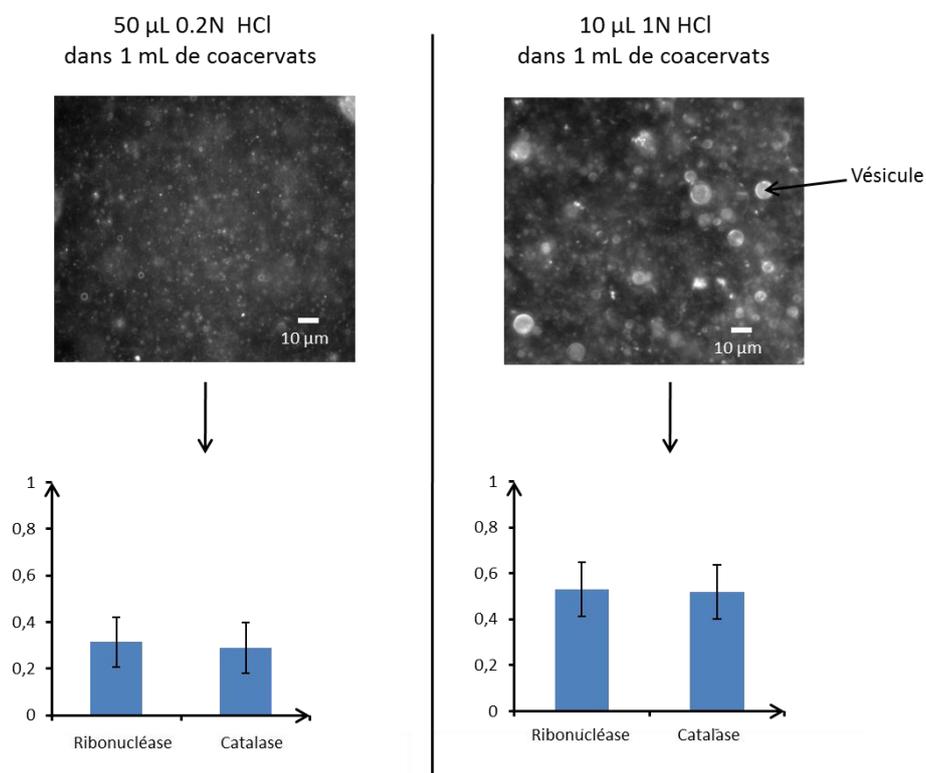


Figure 36 : Influence du volume d'HCl utilisé lors de la transition sur les taux d'encapsulation de la catalase et de la ribonucléase.

Les images au microscope à fond noir montrent des vésicules d'acides gras formées par transition en présence de différents volumes et concentrations en HCl. Les graphiques indiquent les taux d'encapsulation de la ribonucléase et de la catalase en fonction des volumes d'HCl ajoutés.

F/ Expression de protéines dans les vésicules

L'expression des protéines dans les compartiments est une des étapes majeures dans l'élaboration expérimentale de cellules minimales. En collaboration avec le laboratoire « Center for Organized Matter Chemistry » dirigé par Stephen Mann à l'Université de Chimie de Bristol, nous avons mis en place des expériences d'expression de protéines fluorescentes en présence du système cell-free dans les vésicules (Figure 37). Nous avons utilisé un plasmide codant pour l'YFP capable d'être répliqué en présence de systèmes cell-free issu de *E.coli* (Shin et Noireaux, 2010).

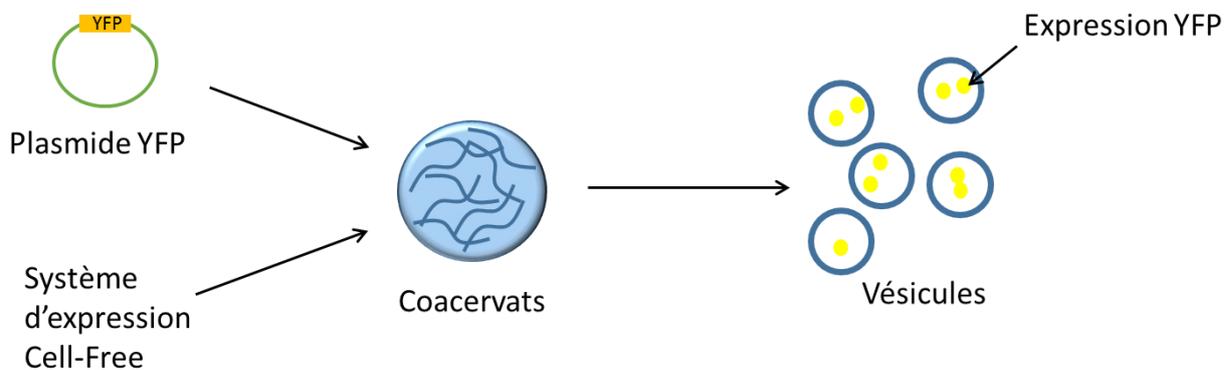


Figure 37 : Méthode d'expression d'YFP dans les vésicules d'acides gras.

Le plasmide contient le gène d'expression de l'YFP. Le plasmide ainsi que le système cell-free sont incubés dans les coacervats puis une fois que la transition est effectuée, la synthèse des protéines permet la production d'YFP.

Nous avons incubé le système cell-free préparé au préalable ainsi que le plasmide codant pour l'YFP dans les coacervats. Cette solution est ensuite séparée en deux échantillons. Le premier est transformé en vésicules, le second est laissé sous forme de coacervats. Les deux échantillons obtenus sont ensuite incubés sur la nuit. La fluorescence émise après expression du plasmide sur la nuit de l'YFP est ensuite mesurée à 550 nm (B). Pour chacun des échantillons, deux mesures témoins sont effectuées dans les mêmes conditions mais en l'absence de plasmide (C) et en l'absence de plasmide et de système cell-free (A). La figure 38

montre qu'en présence de coacervats ou de vésicules, un signal de fluorescence plus important est mesuré dans la condition B que dans les conditions contrôles A et C. Ces résultats suggèrent que la différence de fluorescence entre les conditions B et C correspond bien à la fluorescence générée par la production d'YFP. Ceci implique donc qu'il y a bien synthèse d'YFP en présence de coacervats ou de vésicules.

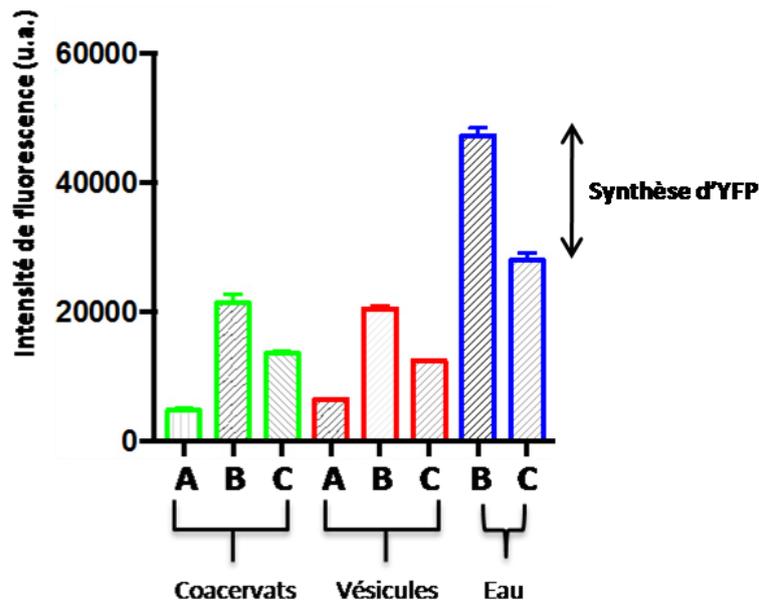


Figure 38 : Quantification de la synthèse d'YFP dans les différents systèmes.

Signal de fluorescence mesuré à 550 nm dans les coacervats (vert), dans les vésicules (rouge) et dans l'eau (bleu). Pour les coacervats ainsi que les vésicules, nous avons mesuré la fluorescence du système seul (A), du système en présence de plasmide et de système cell-free (B) et du système en présence de système cell-free sans plasmide (C). Nous observons que l'intensité de fluorescence est la plus importante en présence de plasmides et de système cell-free.

Le niveau d'expression en présence de coacervats ou de vésicules est faible comparé à celui obtenu dans l'eau. Ceci s'explique par le fait que le pH est plus important dans les coacervats et dans les vésicules ne permettant pas une activité optimale des enzymes. Ces résultats ne permettent cependant pas de déterminer si la synthèse d'YFP s'effectue à l'intérieur des coacervats ou des vésicules. L'observation en microscopie à fluorescence des coacervats ou des vésicules après synthèse d'YFP ne montre pas de signal de fluorescence ni à l'intérieur ni à l'extérieur des coacervats ou des vésicules. L'observation des échantillons de coacervats et

de vésicules montre qu'une partie des acides gras a précipité lors de l'incubation sur la nuit suggérant un effet des protéines, des ions, des cofacteurs présents sur les coacervats ainsi que les vésicules.

4) Conclusion

Ces travaux ont permis la mise en évidence d'un système de transition novateur permettant l'encapsulation de protéines et d'enzymes. Ce système est basé sur la formation dans un premier temps de coacervats due à l'interaction de micelles allongées générées en présence de NaOH et de guanidine. Nous avons montré que les coacervats étaient capables de séquestrer des protéines en quantités importantes (>70%) en fonction de leurs charges et du pH de la solution de coacervats. Nous avons ensuite montré en diminuant le pH ou en ajoutant du décanol que les acides gras initialement structurés en micelles allongées étaient capables de former des vésicules. Ainsi nous avons pu mettre en évidence pour la première fois une transition entre coacervats et vésicules. De plus, nous avons montré que les protéines séquestrées au préalable étaient encapsulées dans les vésicules formées permettant ainsi la mise en évidence d'un nouveau système d'encapsulation de biomolécules dans un compartiment d'acides gras. Les taux d'encapsulation obtenus par cette méthode de transition demeurent plus importants (50-60%) que ceux obtenus par les méthodes d'hydratation de films lipidiques (1 à 40%). Le volume vésiculaire étant très faible (2 μ L pour 1 ml de solution), le facteur de concentration des protéines dans les vésicules est alors de l'ordre de 500. Plusieurs activités enzymatiques ont été quantifiées dans les vésicules nous permettant de montrer que l'encapsulation de l'ensemble des partenaires permet d'augmenter la vitesse de réaction d'un facteur 4. Des réactions plus complexes de production de protéines basées sur l'expression de plasmides en présence de coacervats ou de vésicules ont été mise en évidence malgré les valeurs importantes du pH des systèmes et la précipitation des acides gras.

Chapitre 3

Extraction des protéines de mollicutes dans les vésicules d'acides gras

1) Introduction et objectifs

Dans les deux chapitres précédents nous avons mis en évidence que le système permettait l'encapsulation de molécules dans les vésicules afin de former des bioréacteurs constituant pour l'instant une forme embryonnaire de cellules minimales. Afin d'effectuer des réactions plus complexes dans les vésicules comme des voies métaboliques, nous nous sommes intéressés à l'extraction de protéines de bactéries. L'intérêt réside dans la possibilité d'obtenir directement à partir d'un lysat de bactéries toutes les protéines impliquées dans les voies métaboliques.

Nous nous sommes intéressés aux bactéries de la famille des mollicutes qui constituent un modèle simple et minimal. Parmi ces mollicutes, *Spiroplasma citri* est le premier mollicute à avoir été cultivé (Saglio *et al.* 1976). Il est l'organisme modèle de la classe des mollicutes et est un des organismes les plus utilisés au laboratoire. L'objectif de ces travaux est de séquestrer les protéines de *S. citri* dans les coacervats afin de mettre en évidence des activités enzymatiques ainsi que des voies métaboliques plus complexes à l'intérieur des vésicules.

2) Résultats

A/ Extraction des protéines dans les coacervats

Nous avons dans un premier temps voulu déterminer si les protéines de *S. citri* étaient séquestrées dans les coacervats. Pour cela, nous avons incubé un lysat cellulaire de *S. citri*, obtenu par sonication de cellules lavées, avec une solution de coacervats. Nous avons séparé

les protéines de la phase d'acides gras et de la phase aqueuse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante. La figure 39 montre que les protéines sont localisées dans les deux phases. Contrairement à l'extraction au Triton X-114 (Bordier, 1981), la séquestration observée n'est pas sélective dans la mesure où toutes les protéines sont majoritairement retrouvées dans une phase et dans l'autre. La quantification de l'intensité des bandes sur gel de polyacrylamide montre que plus de 70% des protéines sont localisées dans la phase d'acides gras.

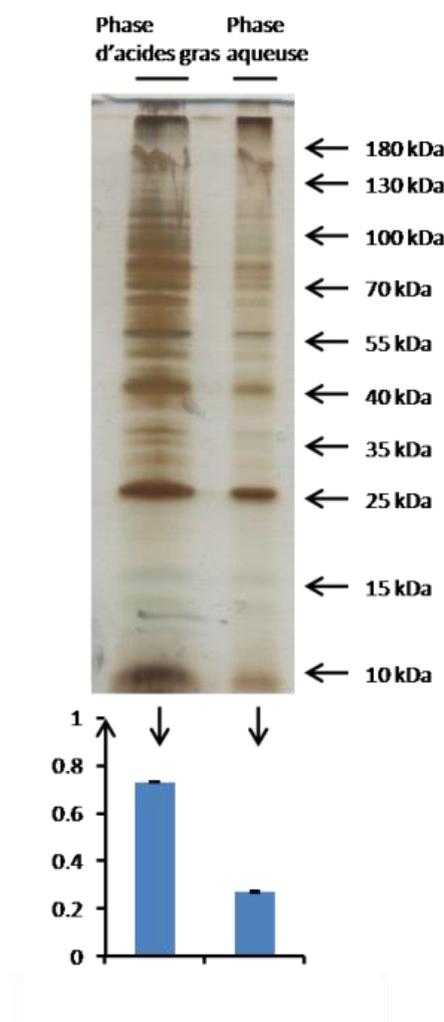


Figure 39 : Partition des protéines de *S. citri* dans les coacervats et dans la phase aqueuse.

Gel d'électrophorèse coloré au nitrate d'argent présentant les profils protéiques de *S. citri* présentes dans les phases d'acides gras et aqueuse. Le graphique représente l'intensité des bandes de chacun des profils exprimés en pourcentage de l'intensité des bandes des deux profils cumulés.

B/ Quantification de l'encapsulation dans les vésicules

Afin de quantifier l'encapsulation des protéines de *S. citri* dans les vésicules nous avons utilisé la méthode de digestion des protéines à l'extérieur des vésicules par la protéinase K. Le lysat cellulaire étant constitué de protéines solubles mais aussi de lipides, il est possible que lors de la formation des vésicules, des protéines ainsi que des lipides de *S. citri* se retrouvent enchâssées dans la membrane d'acides gras. De plus il a été montré que les membranes biologiques sont sensibles à la digestion par la protéinase K, celle-ci entraînant la formation de pores au niveau des membranes (Dingley *et al.* 2005). Nous avons donc utilisé l'YFP comme témoin d'encapsulation afin de vérifier que l'incubation avec la protéinase K n'entraîne pas l'ouverture des vésicules d'acides gras.

Nous avons incubé les protéines de *S. citri* en présence d'YFP dans une solution de coacervats. Nous avons ensuite transformé les coacervats en vésicules puis observé l'échantillon en microscopie à épifluorescence (Figure 40). Nous avons alors observé la présence d'YFP au niveau des vésicules. L'échantillon est ensuite incubé en présence de protéinase K pendant 1 heure à 37°C avant d'être observé en microscopie à épifluorescence. Les images montrent que l'YFP est localisée aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des vésicules (Figure 40). Le control sans ajout de protéinase K quant à lui montre que l'YFP est toujours localisée dans les vésicules après une heure d'incubation à 37°C Ces résultats suggèrent que l'incubation de la protéinase K avec les vésicules entraîne l'ouverture des vésicules. Ceci implique que cette expérience ne permet pas dans ce cas de quantifier l'encapsulation des protéines préalable à l'addition de protéinase K dans les vésicules.

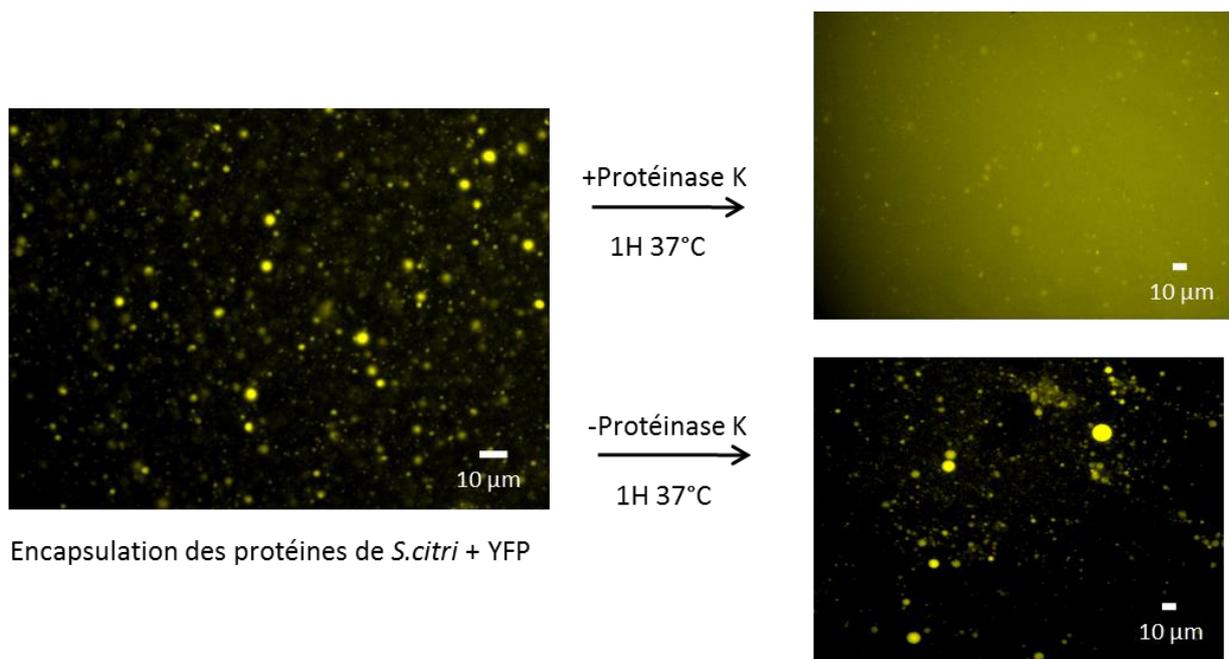


Figure 40 : [Influence de la protéinase K dans la sortie d'YFP hors de vésicules.](#)

Image de microscopie à épifluorescence montrant la localisation de l'YFP en présence des protéines de *S. citri* avant et après 1 heure d'incubation à 37°C avec ou sans protéinase K.

C/ **Activité enzymatique et localisation de la lactate déshydrogénase**

L'ensemble des protéines étant séquestré dans les coacervats nous avons voulu montrer qu'elles étaient encapsulées et actives dans les vésicules. Pour cela, nous avons testé l'activité d'une enzyme dans les vésicules : la lactate déshydrogénase. Cette enzyme tétramérique catalyse la transformation réversible (Baumberger *et al.*, 1933 ; Everse et Kaplan, 1973) du lactate en pyruvate à la fin de la glycolyse, en présence de NADH (Figure 41). La formation ou la consommation du NADH liée à l'activité catalytique de la lactate déshydrogénase peut être suivies par la mesure de l'absorbance à 340 nm, ainsi que par la mesure de la fluorescence de la résorufine. L'activité de la lactate déshydrogénase a été identifiée chez *S. citri* à partir de lysats cellulaires (Chen et Chang, 1994) puis la séquence de l'enzyme a été révélée par séquençage du génome (Carle *et al.*, 2010). Cette protéine est présente chez de nombreux

mollicutes en très grande quantité et est utilisée pour étudier la viabilité et la croissance de ces bactéries en culture (Boarer *et al.*, 1971).

a) Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase dans un tampon

Afin de montrer dans un premier temps que la lactate déshydrogénase conserve son activité après lyse des cellules, nous avons mesuré son activité dans un tampon à pH 7.4 dans les deux sens réactionnels. Nous avons soumis une solution de bactéries lavées à plusieurs cycles de sonication afin d'obtenir l'enzyme libre en solution. Nous avons séparé le lysat cellulaire en deux échantillons. Dans le premier échantillon, nous avons mesuré la consommation de NADH par la lactate déshydrogénase dans le sens de formation du lactate en présence de pyruvate et de NADH (Figure 41). Les résultats en rouge montrent une diminution d'absorbance de 0.8 UA et donc une NADH en solution au cours du temps. Ces résultats suggèrent que l'enzyme est capable d'utiliser le NADH en présence de pyruvate afin de former du lactate. Dans le second échantillon nous avons mesuré la formation de NADH par la lactate déshydrogénase dans le sens de formation du pyruvate en présence de lactate et de NAD. Les résultats en bleu montrent une augmentation de 0.2 UA et de la formation de NADH en solution au cours du temps. Ces résultats suggèrent que l'enzyme est aussi capable d'utiliser le NAD en présence de lactate pour former du pyruvate. Cependant, nous observons sur ce graphique que la consommation de NADH (0.8 U.A. en 10 minutes) est supérieure à la production de NADH (0.2 U.A. en 10 minutes). Ceci montre que l'enzyme fonctionne préférentiellement dans le sens de production du lactate que dans le sens de formation du pyruvate comme cela a été montré précédemment chez d'autres organismes (Clausen, 1969; Doughty, 1998).

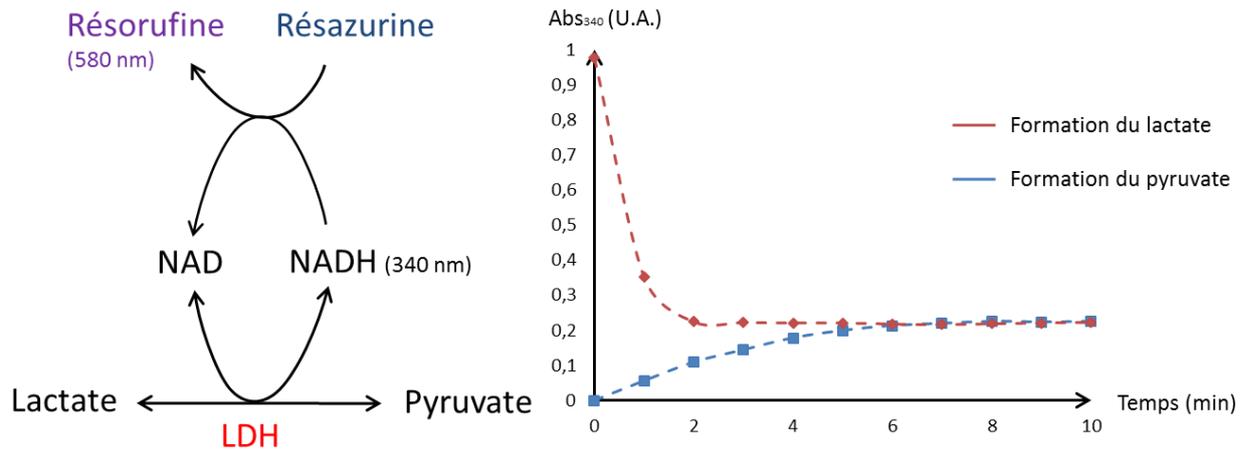


Figure 41 : Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase dans les deux sens réactionnels.

(A) la lactate déshydrogénase catalyse l'inter conversion du lactate en pyruvate en présence de NAD/NADH. La réduction du NAD en NADH en présence de lactate permet la réduction de la résazurine en résorufine par le NADH ce qui génère un signal de fluorescence. (B) Mesure de l'absorbance à 340 nm du NADH au cours du temps dans les deux sens réactionnels de l'enzyme de *S. citri* dans un tampon à pH 7.4. En rouge, la consommation du NADH est mesurée en présence de pyruvate et de NADH. En bleu, la production du NADH est mesurée en présence de lactate et de NAD.

b) Localisation de la lactate déshydrogénase dans les vésicules par fluorescence

Afin de montrer que l'enzyme est localisée dans les vésicules, nous avons mesuré son activité en présence de résazurine (Figure 41). La réduction de la résaurine nécessite la production de NADH par l'enzyme ce qui nécessite de faire fonctionner l'enzyme dans le sens de formation du pyruvate. Nous avons incubé les protéines de *S. citri* issues du lysat cellulaire ainsi que le lactate, le NAD et la résazurine en présence de coacervats. Nous avons ensuite effectué la transition en vésicules et incubé à 37°C. Les images obtenues ne montrent pas de signal de fluorescence à l'intérieur des vésicules ni à l'extérieur. Ces résultats peuvent être dus à une production trop faible de NADH au cours de la réaction, l'enzyme ayant une affinité faible pour le lactate. De plus, nous avons montré que le NAD n'est pas séquestré majoritairement dans les coacervats ce qui implique qu'il est peu encapsulé dans les vésicules. Ceci peut alors expliquer le fait que nous n'observons pas de signal de fluorescence dans les vésicules.

c) *Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase dans les vésicules*

La méthode de fluorescence destinée à localiser l'enzyme dans les vésicules n'a pas permis de montrer la présence de la lactate déshydrogénase dans les vésicules. Cependant, Nous avons observé avec la glucose oxydase que lorsque celle-ci était encapsulée dans les vésicules, la vitesse de réaction était supérieure à celle obtenue en milieu dilué. Ainsi, nous avons procédé de la même façon pour déterminer si la lactate déshydrogénase était active et localisée dans les vésicules. Pour cette expérience, nous avons mesuré la consommation du NADH par la lactate déshydrogénase en présence de pyruvate.

Deux échantillons sont préparés : dans le premier, les protéines de *S. citri* sont incubées dans une solution de coacervats en présence de pyruvate et de NADH. Ces coacervats sont ensuite transformés en vésicules. Dans le second cas la solution de coacervats est transformée tout d'abord en vésicules, puis les protéines de *S. citri* ainsi que le pyruvate et le NADH sont ajoutées. La consommation du NADH par l'enzyme est mesurée au cours du temps dans les deux cas. La représentation de Michaelis-Menten (figure 42) montre que la vitesse de consommation du NADH est bien plus importante lors de l'encapsulation des protéines de *S. citri*, du pyruvate et du NADH. Ces résultats suggèrent qu'une partie de l'enzyme semble fonctionner à l'intérieur des vésicules.

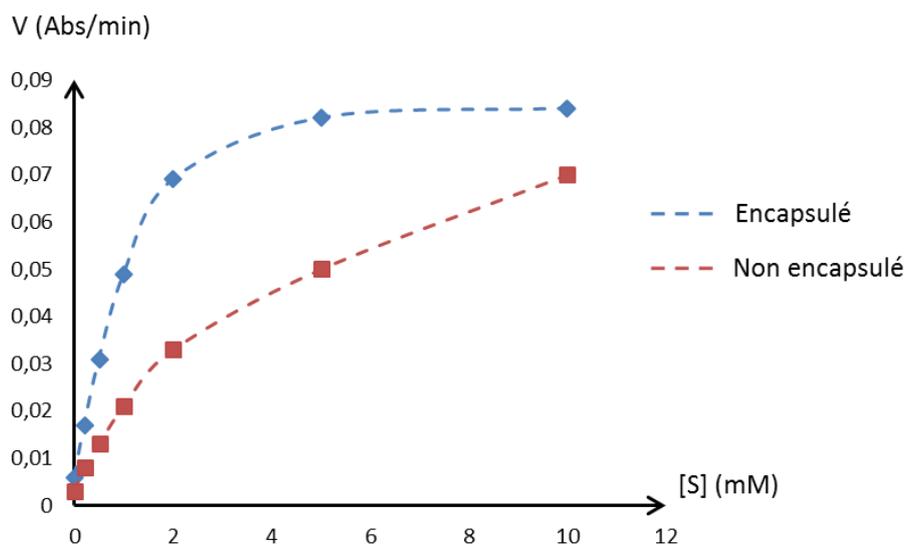


Figure 42 : Cinétique de l'activité de la lactate déshydrogénase à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules.

Cinétiques de Michaelis-Menten en bleu lorsque l'enzyme est encapsulée et en rouge lorsque l'enzyme est à l'extérieur des vésicules. Les résultats montrent que la vitesse de réaction est supérieure lorsque l'enzyme est à l'intérieur des vésicules.

D/ Activité glycolytique dans les vésicules

L'objectif final de ces travaux est de mettre en évidence l'accomplissement d'une voie métabolique à l'intérieur des vésicules. Chez *S. citri*, le séquençage du génome a permis de mettre en évidence la présence de toutes les enzymes de la glycolyse et de la lactate déshydrogénase menant à la formation de lactate (Figure 43). Chez cette bactérie la glycolyse débute par l'entrée du glucose à l'intérieur de la cellule par un transporteur et implique une phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate (G6P)(André *et al.*, 2003, 2005).

Les méthodes expérimentales dont nous disposons nous permettent de suivre la formation et la diminution de NADH. Durant la glycolyse, la seule enzyme permettant la formation de NADH est la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (figure 43). Nous avons donc voulu observer si cette enzyme était capable de produire du NADH en présence de glucose-6-phosphate afin de mettre en évidence une partie de la glycolyse dans les vésicules.

Nous avons incubé les protéines de *S. citri* ainsi que le glucose-6-phosphate, le NAD et l'ATP nécessaire au fonctionnement de la glycolyse dans les coacervats. Une fois la transition en vésicules effectuée, nous avons mesuré la formation du NADH au cours du temps. Les résultats obtenus ne montrent aucune augmentation de l'absorbance à 340 nm au cours du temps. Nous avons effectué la même expérience que précédemment en incubant en plus la résazurine dans les coacervats avant d'effectuer la transition en vésicules. Cependant, nous n'avons pu observer aucun signal de fluorescence au cours du temps. Ceci peut être expliqué de la même façon par le fait que ni le glucose-6-phosphate, ni le NAD et ni l'ATP ne sont séquestrés dans les coacervats ce qui peut limiter leur encapsulation et expliquer l'absence de signal de fluorescence.

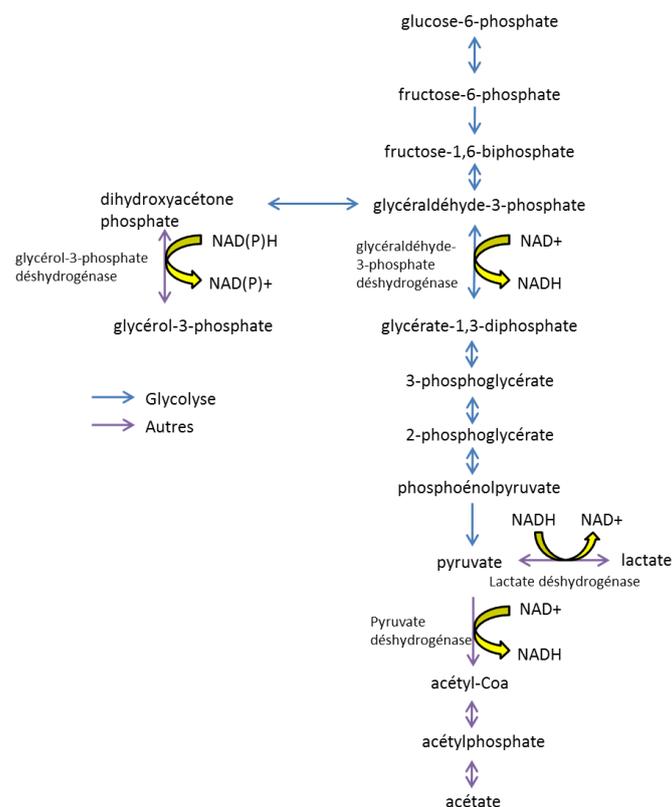


Figure 43 : Glycolyse de *Spiroplasma citri*.

Schéma représentant la glycolyse de *S. citri*. En bleu sont représentées les différentes réactions impliquées dans la glycolyse. Seules les réactions nécessitant du NAD/NADH sont détaillées. Les réactions présentées en violet montrent des enzymes qui ne sont pas impliquées dans la glycolyse mais nécessitant du NAD(P)/NAD(P)H.

3) Conclusion

Ces expériences ont montré qu'au moins les protéines majoritairement présentes dans le lysat cellulaire de *S. citri* sont séquestrées dans les coacervats avec un coefficient de partition d'environ 0.7. La quantification sur gel de polyacrylamide nous a permis de montrer que ces protéines étaient largement séquestrées dans les coacervats (70%). Lors de l'encapsulation de ces enzymes dans les vésicules, nous avons pu montrer que la lactate déshydrogénase était toujours active dans le sens de production du lactate et qu'au moins une partie de l'enzyme était encapsulée. Cette première étape permet de montrer que la lyse des bactéries ainsi que l'incubation dans les coacervats n'ont pas complètement altéré l'activité de l'enzyme. Ces résultats ne permettent cependant pas de quantifier de manière précise la quantité de lactate déshydrogénase présente dans les vésicules. Les expériences de fluorescence visant à localiser l'activité de l'enzyme dans les vésicules n'ont pas abouti. Cette absence de signal peut être expliquée par le fait que le sens réactionnel utilisé dans ces expériences est moins favorable et ne permet pas de produire suffisamment de NADH. Le second objectif de ces travaux était de mettre en évidence une partie de la glycolyse en mesurant le NADH formé en présence de glucose-6-phosphate. Ces expériences n'ont cependant pas permis de montrer une production de NADH ni de fluorescence suggérant ainsi que la glycolyse ne fonctionne pas dans les vésicules dans ces conditions. De plus, nous avons montré que les cofacteurs (NAD, NADH, ATP) ainsi que les substrats (glucose-6-phosphate) ne sont pas séquestrés majoritairement dans les coacervats ce qui peut limiter leur encapsulation et donc l'accomplissement des réactions enzymatiques.

Discussion générale et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé un système d'encapsulation novateur basé sur une transition de structure, qui combine à la fois les avantages des coacervats ainsi que ceux des vésicules. La coacervation d'acides gras est un phénomène qui n'a été montré que dans très peu d'études à ce jour (Ruiz, 2006). Ce système « ouvert » permet de séquestrer des molécules par diffusion à partir de la phase aqueuse contrairement aux systèmes vésiculaires possédant une membrane imperméable. Dans notre système, la coacervation est induite par une interaction de micelles allongées comme c'est le cas majoritairement dans les phénomènes de coacervations basés sur des surfactants (Manohar, 2003). La formation de ces micelles allongées est potentiellement liée à l'interaction entre le groupement carboxylique de l'acide gras et la guanidine qui est largement décrite dans la littérature comme étant une interaction électrostatique combinée à des liaisons hydrogène (Linton et Hamilton, 1999; Zafar *et al.*, 2002). Une des hypothèses sur la formation de coacervats réside dans le fait que la présence d'un excès de guanidine pourrait permettre le rapprochement de ces micelles en solution par des liaisons hydrogène entre micelles *via* le groupement amine libre de la guanidine comme cela avait été décrit dans un système acide oléique/triéthylamine (Kalur et Raghavan, 2005). Les expériences de RMN et de diffusion de neutrons confirment la formation de micelles allongées diluées en solution en présence de concentrations équimolaires d'acides gras, de soude et de guanidine. En présence d'un excès de guanidine, la taille des micelles allongées augmente et la formation de coacervats est observée au-dessus de la température de transition comme cela avait été montré dans d'autres systèmes basés sur des surfactants cationiques (Raghavan et Kaler, 2001).

Les coacervats formés permettent la séquestration de molécules en fonction de leurs charges. Les molécules possédant une charge positive sont séquestrées dans les coacervats potentiellement par interaction électrostatique avec la charge négative du groupement carboxylique de l'acide gras. Les molécules chargées négativement sont davantage rejetées hors des coacervats mais restent localisées dans les deux phases. Cependant, il semblerait que ce ne soit pas la charge globale de la molécule qui influence la séquestration dans les coacervats mais la présence de charges positives. Cet effet a été tout d'abord observé avec des sondes zwitterioniques dont la séquestration était presque totale dans les coacervats suggérant l'importance d'une charge positive pour séquestrer une sonde possédant aussi des charges négatives. Ceci a ensuite été observé avec des protéines : à pH 10, la GFP est localisée dans les coacervats alors que sa charge globale est de -30. Cependant, elle possède 20 charges positives au niveau des lysines ce qui suggère que ces charges sont suffisantes pour pouvoir séquestrer la protéine entière. A pH 11, la chaîne latérale des lysines est déprotonée ce qui entraîne l'exclusion de la protéine des coacervats suggérant alors que la perte de ces 20 charges positives ne permet plus la séquestration de la GFP dans les coacervats. Ainsi, même si la présence de charges positive permet la séquestration de molécules chargées négativement, il semble exister un nombre de charge positives critique, possiblement dépendant de la charge globale de la protéine, nécessaire à la séquestration dans les coacervats. Chez les protéines, ceci se traduit par l'état de protonation des chaînes latérales des acides aminés chargés positivement ce qui implique alors une influence du pH dans les processus de séquestration des protéines dans les coacervats.

L'absence de séquestration des molécules chargées négativement constitue une limite dans l'accomplissement de réactions enzymatiques et de réactions d'expression de protéines que nous voulons mettre en évidence dans les vésicules. Les molécules d'ADN comme les plasmides ou d'ARN ainsi que des cofacteurs indispensables comme l'ATP ou le NAD/NADH sont uniquement chargés négativement ce qui limite leur séquestration dans les coacervats

et donc potentiellement leur encapsulation dans les vésicules. Il serait alors indispensable de mettre en place des méthodes permettant de faciliter dans un premier temps la séquestration dans les coacervats de plasmides en vue de pouvoir optimiser leur encapsulation dans les vésicules. Certaines molécules comme des peptides cationiques (Goparaju *et al.*, 2009 ; Husale *et al.*, 2008), des polymères (Ainalem *et al.*, 2014; Blagbrough *et al.*, 2003; Ronsin *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2008), ou des surfactants (Bhattacharya et Mandal, 1997) peuvent interagir avec l'ADN et servent de vecteurs pour la transfection d'ADN dans des cellules. Ces méthodes constituent une alternative pour pallier l'exclusion de l'ADN des coacervats.

Les acides gras ont un effet détergent sur les complexes enzymatiques (Bull et Breese, 1967; Swarts *et al.*, 1991). La diminution de l'activité enzymatique liée à l'effet détergent des acides gras est observée seulement avec la lactate déshydrogénase tétramérique. Les micelles d'acides gras entraînent potentiellement une dénaturation de l'oligomère de l'enzyme conduisant à une perte de son activité. Bien que les coacervats ne puissent constituer un compartiment viable pour effectuer des réactions enzymatiques complexes, ils constituent néanmoins un compartiment transitoire permettant le stockage des molécules en vue de leur encapsulation dans les vésicules.

Nous avons montré que la transition en diminuant le pH ou en ajoutant du décanol permettait la formation de vésicules. La transition de micelles à vésicules par ces deux méthodes a été largement démontrée, mais jamais à partir de coacervats. Ce système vésiculaire « fermé » permet une encapsulation stricte des molécules à l'intérieur des vésicules. Nous avons montré que la catalase et la ribonucléase pouvaient présenter des taux d'encapsulation dans les vésicules de 40 à 60%. Ces taux d'encapsulation sont nettement supérieurs à ceux obtenus avec les méthodes d'hydratation de films lipidiques (1 à 40%). Cette augmentation d'efficacité demeure cohérente dans la mesure où l'étape de séquestration dans les coacervats permet une première étape de concentration. De plus, les vésicules peuvent aussi être formées en diminuant le pH ou par ajout de décanol à partir des micelles allongées diluées (sans excès de

guanidine). Cependant, cette transition ne permet pas d'encapsuler des biomolécules dans les vésicules ce qui souligne bien l'importance de l'étape de séquestration préalable dans les coacervats pour obtenir des taux d'encapsulation importants. Bien que ces taux soient pour l'instant moins importants que ceux obtenus avec les méthodes de transfert d'émulsions, l'avantage de notre système est la production de quantités de vésicules beaucoup plus importantes et de manière plus simple qu'avec la méthode de transfert d'émulsion. Ainsi, dans une optique de construction de cellules minimales, le fait de générer un nombre important de vésicules augmente les probabilités d'encapsuler toute la machinerie nécessaire à l'expression des protéines. De plus, nous avons montré que ces taux d'encapsulation pouvaient être modulés par le volume d'HCl ajouté. Il est alors possible d'optimiser les conditions permettant d'augmenter de manière significative l'encapsulation dans les vésicules d'acides gras. La réversibilité du système constitue par ailleurs un atout majeur. En effet cette propriété permet d'envisager la réalisation de cycles d'encapsulation en série en jouant sur l'ouverture et la fermeture du système. Ceci peut permettre de nourrir séquentiellement en substrats les enzymes encapsulées dans les vésicules afin d'optimiser des processus de production ou pour permettre l'incorporation de nutriments essentiels au fur et à mesure dans le cas d'une cellule minimale.

Les réactions enzymatiques effectuées dans les vésicules sont plus rapides que celles obtenues en milieu dilué. Ceci s'explique par le fait que la concentration locale en enzymes et en substrats (facteur de concentration : 500) à l'intérieur des vésicules est très importante. Ainsi, pour des faibles concentrations en substrat, le nombre d'événements d'interaction entre l'enzyme et son substrat est très important à l'intérieur des vésicules et beaucoup plus rare en milieu dilué. Les valeurs de K_m obtenues pour l'activité de la lactate déshydrogénase montrent que la réaction est 4 fois plus rapide lorsque l'enzyme est encapsulée dans les vésicules. Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus par des réactions enzymatiques dans d'autres compartiments (Koga *et al.*, 2011). Cependant, il est important de noter que

l'encapsulation de la glucose oxydase et de son substrat n'est pas totale (de l'ordre de 50%), ce qui signifie que la vitesse de réaction observée est bien inférieure à la valeur théorique obtenue si toutes les protéines avaient été encapsulées suggérant qu'une optimisation de l'encapsulation de tous les composés pourrait permettre d'augmenter de manière significative la vitesse des réactions enzymatiques dans les vésicules.

L'expression d'YFP à partir de systèmes d'expression de protéines a été mise en évidence en présence de coacervats ainsi que de vésicules. La présence de grandes quantités de protéines ainsi que d'ions entraînent une précipitation partielle des acides gras potentiellement lié à la présence de cations divalents comme le magnésium. Bien que les valeurs de pH ainsi que les conditions salines ne soient pas favorable à la production de protéines, la synthèse d'YFP est observée en présence de coacervats et de vésicules ce qui constitue une première étape déterminante dans la construction d'une cellule minimale. Les signaux de fluorescence restent trop faibles pour déterminer si la protéine est bien localisée uniquement à l'intérieur des vésicules par observation en microscopie à fluorescence. En perspective, il serait indispensable de pouvoir mettre en évidence les protéines ainsi que les plasmides présents dans les coacervats et de quantifier leur l'encapsulation dans les vésicules Afin d'augmenter les taux d'expressions de l'YFP pour déterminer sa localisation et de diminuer la précipitation des acides gras afin de générer un maximum de vésicules exprimant l'YFP, cela nécessitera vraisemblablement l'optimisation des conditions d'expression protéiques et notamment celle de la composition du mélange cell-free.

Les protéines de *S. citri* sont majoritairement localisées dans les coacervats (70%) démontrant l'efficacité du système à séquestrer de grandes quantités de protéines. Ce résultat suggère qu'il est possible d'encapsuler l'ensemble des protéines nécessaires à l'accomplissement de voies métaboliques. Ce point est important dans la mesure où il confirme la viabilité du système pour l'élaboration de cellules minimales. L'addition de protéinase K entraîne l'ouverture des vésicules constituant un obstacle pour la quantification des protéines

encapsulées dans les vésicules. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les protéines membranaires sont digérées pouvant entraîner une perte de l'intégrité de la membrane d'acides gras et donc des vésicules (Dingley et al. 2005). La séparation des vésicules d'acides gras n'est à l'heure actuelle pas possible avec les méthodes utilisées généralement pour d'autres systèmes (Apel *et al.*, 2002 ; Dolatmoradi et El-Zahab, 2016 ; Xu *et al.*, 2016 ; Zonneveld *et al.*, 2014). En effet, la centrifugation rapide casse les vésicules d'acides gras ce qui conduit au relargage de la majorité du contenu intravésiculaire. Cet effet est aussi observé avec des méthodes de filtration sur des colonnes commerciales. La séparation des vésicules par micro-fluidique n'est, dans notre cas, pas applicable dans la mesure où les volumes utilisés restent beaucoup trop important pour ces technologies. Certaines méthodes basées sur l'agrégation des vésicules en solution (Carmona-Ribeiro et Chaimovich, 1986; Minami *et al.*, 1996 ; Ohki et Ohshima, 1999 ; Yang *et al.*, 1997) pourraient constituer un moyen expérimental de séparer les vésicules afin de quantifier de manière précise les protéines encapsulées.

Nous avons donc utilisé une approche de fluorescence basée sur la réduction de la résazurine par du NADH ou de mesure d'absorbance du NADH afin de mettre en évidence l'activité d'enzymes comme la lactate déshydrogénase ou la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. L'activité de la lactate déshydrogénase a été indirectement mise en évidence dans les vésicules. Ces expériences montrent que l'enzyme reste fonctionnelle même après la lyse des cellules et l'incubation dans les coacervats. Dans un second temps ces résultats montrent que malgré la charge négative du NADH et du pyruvate, l'encapsulation est suffisante pour mettre en évidence l'activité de l'enzyme. Cependant, nous avons mis en évidence l'activité de l'enzyme dans un seul sens réactionnel. Dans le sens de production du pyruvate, les résultats ne montrent ni production de NADH ni production de fluorescence. Une première hypothèse pour expliquer cette absence d'activité est que le NAD ainsi que le lactate sont très peu encapsulés dans les vésicules. Cependant, les charges ainsi que les structures chimiques entre le pyruvate/lactate et le NAD/NADH sont tellement proches

(charge globale -1) que de toute évidence, l'encapsulation de ces composés doit être assez proche. Ceci implique que l'absence d'activité dans ce sens réactionnel est potentiellement due à l'enzyme. Celle-ci à moins d'affinité pour le pyruvate dans les conditions optimales ce qui peut expliquer que dans les conditions de pH de notre système de transition, l'enzyme n'ait pu fonctionner dans ce sens réactionnel.

Afin de reconstituer la glycolyse dans les vésicules d'acides gras, nous avons mesuré la production du NADH par la glycéraldéhyde-3-phosphate en présence de glucose-6-phosphate en excès afin de mettre en évidence une partie de la voie métabolique. La production de NADH au cours du temps en présence de glucose-6-phosphate par la glycéraldéhyde-3-phosphate n'a pas pu être montrée suggérant le fait que les premières étapes de la glycolyse ne s'effectuent pas dans les vésicules. Cependant, le NADH peut être pris en charge par d'autres enzymes comme la lactate déshydrogénase ou la glycérol-3-phosphate déshydrogénase. Ainsi, le NADH pourrait être produit par la glycéraldéhyde-3-phosphate en présence de glucose-6-phosphate. Cependant, une fois produit, le NADH pourrait être consommé directement par la glycérol-3-phosphate ou la lactate déshydrogénase constituant l'équilibre du système. Ceci pourrait expliquer le fait que nous n'observons pas de production de NADH au cours du temps. L'absence de production de NADH peut aussi être expliquée par le fait que certaines enzymes de la glycolyse n'ont pas été encapsulées dans les vésicules ne permettant pas l'accomplissement de la glycolyse. De plus, la séquestration très partielle des cofacteurs comme le NAD/NADH, l'ATP ou même le glucose-6-phosphate qui demeure chargé négativement à ce pH peut entraîner une encapsulation de ces composés insuffisante pour effectuer l'ensemble des réactions. Pour finir, les conditions saline et le pH des coacervats peu optimales pour le fonctionnement des enzymes peuvent aussi expliquer l'absence de production de NADH (Erecińska *et al.*, 1995). L'ensemble de ces résultats montrent bien l'importance de la mise en évidence d'une méthode permettant de quantifier et de déterminer les enzymes encapsulées lorsque nous travaillons avec des quantités d'enzymes

importantes (Protéines de *S. citri* et cell free). Ces méthodes couplées à de la spectrométrie de masse pourraient nous permettre de déterminer qualitativement les protéines encapsulées. De plus, afin de déterminer de manière plus précises les réactions enzymatiques effectuées dans les vésicules, Il serait alors important de pouvoir quantifier les métabolites formés au cours de la réaction, par RMN par exemple à l'aide de substrats marqués, afin de déterminer la quantité de produits issus de la glycolyse dans le but de déterminer les étapes ayant fonctionnées.

En conclusion, le système de transition de coacervats à vésicules reste un système novateur, simple et efficace pour encapsuler des biomolécules. Les taux d'encapsulation importants en font un modèle viable de microréacteur ainsi que pour l'élaboration de cellules minimales. De plus, les vésicules d'acides gras constituent un excellent modèle biomimétique dans la mesure où ils entrent directement dans la composition des membranes biologiques. De plus, malgré le fait qu'aucun phénomène de division basé sur des systèmes protéiques n'aient été montrés, les vésicules constituent un compartiment naturel capable de se diviser. Dans l'optique d'une construction de cellule minimale dont l'un des pré requis indispensable demeure la division cellulaire, ce compartiment basé sur des acides gras constitue un modèle prometteur.

Matériels & Méthodes

Matériels et Méthodes

1) Préparation des échantillons d'acides gras

Une solution mère d'acide gras est préparée. 10 mg/ml d'acides gras (acide myristique : C14 :0, acide palmitique C16 :0 et acide stéarique : C18 :0) protonés (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) ou deutérés (Eurisotop Saclay, France) puis mélangées avec 8.7 ml d'une solution de chlorure de guanidine (GuHCl, Sigma-Aldrich, réf : G4505) 1M ainsi que 8.7 ml d'une solution de NaOH 1M dans 200 ml d'eau MilliQ. La solution est ensuite soumise à 3 cycles de congélation/décongélation avant d'être aliquotée par 5 ml puis stockée à -20°C. Avant d'être utilisée, chaque échantillon est chauffé à 80°C pendant 10 minutes. Afin de former des coacervats d'acides gras, 300 µL d'une solution de chlorure de Guanidine 1M sont ajoutés en excès ainsi que 30% de Triton X114 (Sigma-Aldrich, réf. : X114) qui permet de diminuer la température de transition et permettre de travailler plus simplement à température ambiante (3mg/ml final). Les vésicules sont préparées par l'ajout de 5 à 15 µl d'une solution d'acide chlorhydrique 1M ou de 50µl d'une émulsion de décanol (Sigma-Aldrich, réf : 150584) sous agitation à 1ml de solution de coacervats. L'émulsion de décanol est préparée par sonication (3 cycles de 10 secondes) d'un mélange de décanol (50µL), de 50µL de solution stock d'acides gras/GuHCl (1/1/1) ainsi que de 1.5 ml d'eau MilliQ. Afin de former des coacervats à partir de vésicules, 5 à 15 µL d'une solution de NaOH 1M sont ajoutés sous agitation à la solution de vésicules. Le rouge de Nile (Sigma-Aldrich, réf : 72485) est utilisé à une concentration de 1 mg/ml dans du chloroforme. 2 µL sont ensuite ajoutés à une solution de 1 ml de coacervats.

2) Méthodes de caractérisation

A/ RMN du solide

Afin d'étudier l'aspect structurale de ce système, des expériences de RMN ont été effectuées. 1 ml d'une solution d'acides gras deutérés est préparé comme décrit précédemment. L'échantillon est ensuite placé dans un rotor ZrO_2 (Cortecnet, Paris, France) de 100 μ L. Les expériences sont ensuite effectuées en mode statique à 76.8 MHz pour le deutérium sur un spectromètre Bruker Advance II 500 WB (Bruker, Wissembourg, France) avec une sonde CP-Mas 4 mm $^1H/^2H$. Les séquences des échos quadrupolaires sont effectuées par enregistrement d'un signal soumis à une transformée de Fourier avec un filtre Lorentzien de 100-200 Hz. La durée d'impulsion ainsi que le temps de délai de l'écho sont respectivement de 2.75 μ s et de 40 μ s, la fenêtre spectrale de 500 kHz. 4000 acquisition ont été effectuées avec un temps de répétition de 1.5 s. La température est contrôlée à $\pm 1^\circ C$.

B/ Diffusion de neutrons (SANS)

Les expériences de diffusion de neutrons ont été effectuées au laboratoire Léon-Brillouin (Laboratoire mixte CEA/CNRS, Saclay, France) sur le spectromètre PACE. La longueur d'onde utilisée pour les neutrons a été sélectionnée à 5 ou 13 Å, le détecteur étant positionné à 1.3 et 5 mètres. Le vecteur d'onde de diffusion, Q, est alors compris entre 0,003 et 0,5 Å⁻¹, avec un chevauchement important entre les trois configurations. Les échantillons ont été préparés avec de l'eau deutérées puis déposés dans une cuve en quartz. Le trajet optique est de 2 cm et la température est contrôlée par un fluide circulant à plus ou moins 0.2°C. Le spectre a été corrigé en fonction du solvant, de la cellule et de la diffusion incohérente. La théorie utilisée pour l'ajustement des données SANS peut être trouvée dans la littérature (O'Glater 1982). L'intensité diffusée peut être décrite comme le produit d'un facteur de structure S(Q),

caractéristique des corrélations entre objets, ainsi que par un facteur de forme $P(Q)$ décrivant la forme des objets. Les principales équations ici utilisées pour les lipides incorporés, soit dans des micelles en interaction (cylindriques ou sphériques), soit dans des membranes plates empilées, sont rappelées ci-dessous. Le facteur de forme d'un objet sphérique plein de rayon R est donné par :

$$P_{\text{sph}}(Q) = 9 * ((\sin(QR) - QR \cos(QR)) / (QR)^3)^2$$

Le facteur de forme d'un cylindre à orientation aléatoire avec une base de rayon R et une hauteur pratiquement infinie (une tige allongée est un modèle approprié pour les micelles allongées) est donnée par :

$$P_{\text{tige}}(Q) \propto (1/Q) * (J_1(QR)/Q)^2$$

Où J_1 est la fonction de Bessel d'ordre 1.

Dans le cas d'un seul cylindre de hauteur d , de base pratiquement infinie avec aucune orientation préférée (c'est-à-dire une plaquette plate orientée de manière aléatoire, un modèle approprié pour décrire des bicouches indépendantes) le facteur de forme devient :

$$P_{\text{plaque}}(Q) \propto \sin^2(Qd/2) / Q^4$$

C/ Microscopie

Les coacervats ainsi que les vésicules sont observés à l'aide de différents microscopes. L'ensemble des observations est effectué à température ambiante, les échantillons sont déposés entre lames et lamelles. Pour certaines observations, deux lamelles peuvent être fixées sur la lame à l'aide de Gélatine 1%. Une troisième lame est alors fixée sur les deux lamelles fixées précédemment ce qui permet d'obtenir un canal facilitant l'observation.

a) Microscope à fond noir

Le microscope à fond noir est principalement utilisé afin de vérifier l'état structural des coacervats ainsi que des vésicules, la présence de cristaux ou la localisation de sondes colorées ou de protéines. Les observations sont effectuées sur un Nikon Ni Optical microscope (Nikon, Japan) équipé d'une caméra Digital Sight Qi1Mc permettant l'acquisition d'images avec le logiciel NIS Element BR imaging. Le grossissement utilisé est le 40X.

b) Microscope à épifluorescence

Le microscope à épifluorescence est utilisé pour observer les protéines fluorescentes en présence de coacervats ou de vésicules. Les observations sont effectuées sur un Nikon Eclipse 800 équipé d'une Coolsnap HQ2 digital camera (Photometrics) permettant l'acquisition d'images à l'aide du logiciel METAVUE 7.7.1 (Roper Scientific, France).

Les échantillons sont préparés par mélange de 50 μ l d'une solution stock de 2mg/ml de YFP recombinante avec 1 ml d'une solution de coacervats. 100 μ l d'une solution à 0.5mg/ml de protéines marquées au FITC sont mélangées avec 1 ml de solution de coacervats. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 20 minutes à 30°C et agités avant l'acquisition des images. Les transitions de coacervats en vésicules et inversement sont effectuées comme décrites précédemment. Les différents fluorophores utilisés ainsi que les longueurs d'ondes d'excitation et d'émissions sont répertoriés dans le tableau 2

Tableau 2: Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des fluorochromes utilisés

	Longueur d'onde (Excitation/Emission)
Rouge de Nile	550/650
Résorufine	550/580
YFP	515/550
GFP	480/500
FITC	495/520
Fluorescéine	480/520

c) *Microscopie confocale*

La microscopie confocale est utilisée pour déterminer si les molécules ou les objets observés sont localisés à la surface des coacervats ou à l'intérieur. Les observations sont effectuées sur un microscope confocal Leica (TCS SP2) avec une immersion de 40x dans l'eau et de 63x dans l'huile. Les lames utilisées pour ce genre d'acquisition sont des lames à fond incurvées qui permettent de ne pas aplatir les coacervats entre la lame et la lamelle et éviter les mouvements browniens trop importants en vue d'une acquisition séquentielle. Les échantillons sont préparés de la même façon que pour l'observation au microscope à épifluorescence.

D/ **Marquages fluorescents**

La catalase (Sigma-Aldrich, réf C1345) et la ribonucléase (Sigma-Aldrich, réf : R6513) ont été marquées par du Fluorescéine Iso ThioCyanate (FITC, Sigma-Aldrich, réf : F7250). Des solutions de catalase et de ribonucléase ont été préparées à 2mg/ml dans de l'eau MilliQ. En parallèle, le FITC est solubilisé dans de l'acétone à une concentration de 1mg/ml. 50 µL de FITC sont

ajoutés très lentement à 1ml de solution de protéines tout en agitant. La solution est ensuite incubée à 4°C pendant 12 heures. Le FITC n'ayant pas réagi est séparé des protéines en utilisant une colonne d'exclusion de taille PD-10 (GE Healthcare life sciences, UK, réf 17-0851-01). Afin de déterminer le taux de FITC ayant réagi avec les protéines, les absorbances à 280 nm et à 495 nm respectivement pour les protéines et le FITC sont mesurées. Un ratio Abs_{495}/Abs_{280} permet de déterminer le taux de fixation du FITC sur les protéines et doit se situer entre 0.3 et 1. Des valeurs inférieures ne permettent pas d'avoir un signal correct alors que des valeurs supérieures font apparaître un bruit de fond important.

E/ Séquestration des sondes moléculaires

La séquestration des sondes moléculaires dans une phase aqueuse ou huileuse est caractérisée par un coefficient de partition nommé P. Ce coefficient de partition est une mesure de la solubilité différentielle de composés dans l'eau et dans l'octanol. Le $\text{Log}(P)$ est égal au logarithme du rapport des concentrations du composé étudié dans l'octanol et dans l'eau : $\text{Log}P = \text{Log}(C_{\text{oct}}/C_{\text{eau}})$. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou lipophile d'une molécule. En effet, si le $\text{Log}P$ est positif, cela exprime le fait que la molécule considérée est plus soluble dans l'octanol que dans l'eau ce qui reflète son caractère lipophile. Lorsque ce coefficient de partition est rapporté à la valeur du pH, le coefficient de partition obtenu est nommé D. Toutes les valeurs des coefficients de partitions ont été collectées pour chacune des 30 sondes moléculaires que nous avons utilisées. Une solution mère de chacune des sondes moléculaires utilisée est préparée à 2 mg/ml. 100 μL sont ensuite incubés dans une solution de 5 ml de coacervats. Une fois la séparation de phase obtenue, les échantillons sont photographiés afin de montrer la partition de chacune des sondes.

3) Matériel biologique

A/ *Spiroplasma citri*: souches et conditions de culture

La souche de *S. citri* GII3 a été isolée à partir de cicadelles capturées au Maroc et est cultivée à 32°C dans un milieu SP4 dont la composition est définie dans le tableau 3.

Tableau 3 : Composition du milieu SP4

Base autoclavée (30 min/115°C)	
Mycoplasma Broth Base	1 g
Peptone	1.6g
Tryptone	3g
Rouge de phénol 0.5%	1.2 ml
pH	7.8
Qsp H2O	205 ml
Additifs stériles (filtrés sur 0.45µm)	
Sérum de veau fœtal (décomplémenté 1 h à 56°C)	50 ml
CMRL 1066 (acides aminés et vitamines)	15 ml
Yeastolate 4% (p/v)	25.5 ml
Glucose 50%	3 ml
Penicilline G à 200000 unités/ml	1.5 ml

La croissance de *S. citri* est suivie par le changement de couleur d'un indicateur coloré : le rouge de phénol dont la coloration est dépendante du pH de la solution. Au cours de leur croissance, les spiroplasmes vont produire de l'acide Lactique ce qui a pour conséquence de diminuer le pH et ainsi changer la couleur du milieu. Le rouge de phénol n'étant qu'un indicateur, chaque culture est observée au microscope à fond noir, le titre de la culture en fin de phase stationnaire étant de 10^8 à 10^9 bactéries par ml. La culture est alors repiquée au $1/10^{\text{ème}}$ dans du SP4 frais ce qui correspond à un passage.

a) *Extraction de protéines de S. citri dans les coacervats*

2 Litres de cultures sont effectués dans le but de constituer une réserve de bactéries. Une fois que l'indicateur coloré vire au jaune, l'ensemble du volume est centrifugé à 20000g pendant 30 minutes à 4°C par 250 ml. Les culots de cellules sont ensuite remis en suspension dans le minimum de volume de tampon HEPES-Saccharose (8mM HEPES, 280mM Saccharose, pH 7.4). Cette opération est répétée 3 fois dans le but de laver les spiroplasmes. Une fois les lavages effectués, les bactéries sont centrifugées dans des tubes eppendorf 1 ml dans le but de récupérer l'équivalent de 50 ml de culture dans un tube. A la fin de la dernière centrifugation, les culots sont congelés à sec à -20 °C.

Le culot est ensuite décongelé puis incubé dans de la glace le temps que la décongélation soit complète. Le culot est ensuite remis en suspension dans 1 ml de tampon HEPES-saccharose. Une fois repris, l'échantillon va subir différents cycles de sonication (5 cycles de 15 secondes de sonication entrecoupés de 30 secondes dans la glace). Une fois ces différents cycles terminés, 10 µL de solution sont prélevés pour les expériences de réactions enzymatiques, et mélangés à 1 ml de solution de coacervats ou de vésicules. La solution est ensuite incubée 15 minutes à 32°C pour permettre une extraction plus complète des protéines.

Afin de déterminer la partition des protéines de *S. citri* dans les coacervats, nous avons repris un culot de 50 ml de cultures dans 5 ml d'une solution de coacervats. L'échantillon est ensuite incubé sur la nuit à 32°C. Les deux phases sont ensuite séparées et récupérées. 100 µL de chacune des phases sont incubées dans un tampon Laemmli2X (Tris-HCl pH 6.8, B-mercaptoéthanol 10%(v/v), SDS 4% (m/v), bleu de bromophénol 0.2% (m/v) et Glycérol 20% (v/v)) pendant 20 minutes. Les échantillons sont ensuite incubés 3 minutes à 95°C avant que 5µL de chacun des échantillons soient déposés sur gel de polyacrylamide.

B/ *Escherichia coli* : souches et utilisation

La souche utilisée pour les besoins des expériences menées est la souche BL21 Star (DE3). Cette souche est largement utilisée pour la production de protéines et de peptides recombinants. Elle permet d'améliorer le rendement de production dans un système d'expression utilisant le promoteur T7 comme cela est le cas pour le vecteur d'expression pET28(+). Cette souche porte une mutation dans le gène codant pour la RNase E qui est la principale source de dégradation des ARNm. Cette souche est cultivée dans un milieu LB (tableau 4) liquide à 37°C sous agitation (180-200 rpm/min)

Tableau 4 : Composition du milieu LB

Composants	LB
Tryptone	10 g
Yeast extract	5g
NaCl	10g
H2O	Qsp 1L
pH	7
Agar (si milieu solide)	15g

a) Synthèse de YFP recombinante

i. Plasmides

Le plasmide pET28a (+) est un vecteur d'expression (société Novagen) qui permet le clonage et l'expression de protéines recombinantes dans *E.coli*. Il possède l'origine de réplication pBR322 ainsi que deux gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. Le gène cible codant pour la YFP est placé sous la dépendance d'un promoteur fort du bactériophage T7 inducible par l'isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside (l'IPTG). Ce plasmide porte également deux séquences composées de six résidus Histidines présents de part et d'autre du site de clonage permettant l'étiquetage aussi bien en N-terminal qu'en C-terminal.

ii. Transformation

La transformation au chlorure de calcium (Mandel et Higa, 1970) a été utilisée pour la transformation de la souche d'*E.coli* BL21 star (DE3) par le vecteur d'expression pET28(+) contenant la séquence du gène de la YFP. Pour chaque transformation, 3 ml de culture ont étéensemencés et incubés à 37°C sous agitation. A partir du moment où l'absorbance à 550 nm atteint 0.6, les cellules sont incubées dans la glace pendant 30 minutes puis centrifugées à 4°C pendant 10 minutes à 5000g. Le culot de cellules est remis en suspension dans 2 ml d'une solution à 54 mM de CaCl₂. Après une incubation de 15 minutes dans la glace, les cellules sont centrifugées à nouveau à 4°C pendant 10 minutes à 5000 g. Le culot de cellules est ensuite remis en suspension 200µL de CaCl₂ glacé et stérile. Les bactéries devenues alors chimiocompétentes sont mélangées à 1 µg de plasmide pET28(+) pendant 30 minutes dans la glace. Le mélange est ensuite incubé 60 secondes à 42°C dans un bain-marie. 1ml de LB est alors ajouté au mélange qui est alors incubé 1 heure à 37°C. 250µl sont alors déposés sur milieu LB solide en présence d'ampicilline (100µg/ml) et incubés à 37°C sur la nuit.

iii. Production de protéines recombinantes

Un transformant est repiqué puis cultivé dans 500 ml de LB contenant 30 µg/µL de kanamycine jusqu'à atteindre une valeur de densité optique à 600 nm de 0.6 ce qui correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance. Dans ce système d'expression, l'expression du gène codant pour la YFP est sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. La concentration d'IPTG ainsi que le temps d'induction peuvent être variables selon le taux d'expression et la propension à former des corps d'inclusion. La His₆-YFP est alors produite à 28°C en ajoutant 0.05mM d'IPTG pendant 12 heures. La culture est ensuite centrifugée à 7000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est ensuite repris dans un tampon de lyse (50mM Tris ; 0.3M NaCl, pH 8). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante en présence de lysozyme à une concentration de 0.2 mg/ml, le mélange est soumis à plusieurs

cycles de sonication (30 secondes de sonication en alternance avec 30 secondes dans la glace) jusqu'à ce qu'un lysat soit obtenu. Le lysat est ensuite centrifugé à 13000g pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant contenant la protéine d'intérêt est récupéré.

iv. Purification des protéines recombinantes

En pratique, le protocole consiste à éluer la protéine sur une colonne d'affinité de nickel permettant une première purification. La protéine subit ensuite un passage sur une colonne échangeuse d'ions ce qui élimine les contaminants éventuels.

La résine utilisée pour la purification de la YFP recombinante est une résine IMAC (immobilized Metal Affinity Chromatography) utilisant un ion nickel (Ni-NTA). L'ion Ni^{2+} possède six liens de coordination, quatre sont sollicités par le NTA pour l'immobiliser sur la résine et deux peuvent interagir avec les chaînes latérales des résidus histidines.

Nous avons utilisé une résine pré-chargée en Nickel (Bio-Rad) pour un volume final de colonne de 1ml. Avant de déposer les échantillons sur la colonne, cette dernière est lavée à l'aide de 10 volumes d'eau MilliQ afin d'éliminer les traces d'éthanol puis elle est équilibrée à l'aide de 10 volumes de tampon de lyse. Après ces séries de lavage, le surnageant récupéré précédemment est chargé sur la colonne. Les protéines éluées sont récupérées par fraction de 1 ml. Une fois la totalité de l'échantillon passé à travers la colonne, celle-ci est lavée à l'aide de 10 volumes de tampon A+ 0.1% Triton X-100 (tableau 5) puis ensuite par 10 volumes de tampon A afin d'éliminer le Triton X-100.

Tableau 5 : Composition du tampon de lyse utilisé pour la lyse des bactéries au cours de l'expression des protéines recombinantes.

Tampon A	
Na ₂ HPO ₄ 0.1 M	40.5 ml
NaH ₂ PO ₄ 0.1M	9.5 ml
NaCl	0.25 M
H ₂ O	Qsp 100 ml

L'élution des protéines recombinantes se fait par compétition avec l'imidazole pour la fixation avec le nickel. 3 ml de concentration croissante d'imidazole (0.05M ; 0.1M ; 0.5M) en solution dans le tampon A sont chargés sur la colonne. Les fractions sont récupérées par volumes de 1 ml. 50 µl de chacune des fractions sont testés par SDS-PAGE afin de déterminer la quantité de protéines dans chacune des fractions.

Une fois l'élution terminée, la colonne est lavée avec 10 volumes de tampon A + 0.5 M Imidazole suivi de 10 volumes d'éthanol 20%. Après avoir déterminé par SDS-PAGE les fractions contenant la YFP, celles-ci sont déposées sur une colonne d'exclusion de taille de type PD-10. Cette colonne permet la séparation d'objets de masse moléculaire supérieure à 5000 Da : les molécules de masse inférieure vont pouvoir pénétrer dans les pores de la matrice et vont être éluées plus tardivement que les molécules de masse supérieure.

La colonne est équilibrée avec un tampon phosphate (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, pH 8). Ce tampon va être utilisé pour éluer la protéine et la conserver. Le volume maximal pouvant être chargé sur la colonne est de 2.5 ml, les fractions des échantillons vont être chargées par volumes de 1 ml. Une fois la solution de protéines entièrement pénétrée dans la matrice, 2.5 ml de tampon phosphate sont ajoutés. Les fractions récupérées sont ensuite dosées, aliquotées et conservées à -20°C dans le tampon phosphate précédemment cité.

c) Système cell-free

Le système cell-free utilisé pour exprimer la GFP a été préparé selon Shin et Noireaux (Shin et Noireaux, 2010, 2012). Ce système d'expression est composé à 33% d'extrait brut de *E.coli* et à 66% d'un mélange des composants suivants : 50 mM HEPES pH 7.6, 1.5mM ATP et GTP, 0.9 mM CTP et UTP, 1 mM de spermidine, 0.75 mM de c-AMP, 0.33 mM de NAD, 0.26 mM de coenzyme A, 30 mM d'acide phosphoglycérique, 0.068 mM d'acide folique, 0.2mg/ml de tRNA, 1 mM d'IPTG, 1 mM de chacun des acides aminés, 2% PEG 8000, 6.5 mM de glutamate magnésium et 50 mM de glutamate potassium

4) Méthodes d'analyse

A/ Quantification des protéines

a) Spectrométrie UV-Visible

Les spectres ont été enregistrés sur un spectrofluorimètre Xenius XC UV-visible (Safas, Monaco) à 25°C à l'aide d'un thermorégulateur Ministat 125 (Huber, Germany). Des solutions de 1 mg/ml de lipases (Sigma-Aldrich réf : L3126), de marqueurs de poids moléculaires (GE Healthcare life science, UK, réf : 17-0446-01), de Horse Radish Peroxydase (Sigma-Aldrich réf : P8375), de glucose oxydase (Sigma-Aldrich réf : G7141), de phosphatase alcaline (Sigma-Aldrich réf : P4552), de protéinase K (Sigma-Aldrich, réf : P2308), de ribonucléase A et de catalase ont été préparées. 50µL de solution de protéines sont ajoutés indépendamment à 1ml d'une solution de coacervats et incubés 12 heures à 30°C ce qui permet une séparation de phase complète. Les deux phases sont ensuite séparées à l'aide d'une pipette Pasteur ce qui permet d'éviter les contaminations d'une phase par une autre. 1 ml de chaque phase est récupéré, puis, 20 µL de chacune des phases sont dilués dans 980µL d'eau MilliQ avant d'être analysée. L'acquisition des spectres est effectuée par mesure de l'absorbance entre 200 et

400 nm ce qui nous permet d'être dans la gamme de longueur d'onde pour quantifier les protéines. Dans le cas des spectres de fluorescence pour la quantification des réactions enzymatiques, se référer à la section suivante « Réactions enzymatiques » pour plus de détails sur les réactions. Après séparation des deux phases, 50µL de chaque phase sont récupérés puis dilués dans 1 ml d'eau MilliQ avant d'être analysés. L'acquisition des spectres a été effectuée par mesure de la fluorescence émise. La partition des sondes moléculaires a aussi été effectuée par mesure UV-visible à 25°C. Les différentes sondes sont incubées dans une solution de coacervat comme décrit précédemment. Dans le cas de la fuchsine basique, le bleu de toluidine, la rhodamine 6G, le brillant blue R et la rhodamine B, 100 µL de la phase d'acides gras sont dilués dans 1 ml d'eau MilliQ. Dans le cas de la calcéine, du bleu de bromocrésol, du bleu de bromophénol ainsi que du xylène cyanol, 500 µL de chacune des phases sont prélevés. L'absorbance entre 400 et 800 nm est ensuite effectuée pour chacune des phases.

b) Séparation des protéines en gel d'électrophorèse

Dans le système SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis), les protéines saturées par les molécules de SDS (détergent anionique) chargées négativement vont migrer dans un champ électrique en fonction de leur masse. Les gels de polyacrylamide utilisés sont coulés entre deux plaques de verres séparées par une bande de Téflon de 1.5 mm d'épaisseur. Les échantillons sont incubés dans le même volume de tampon Laemmli 2X avant d'être déposés sur gel.

i. Gels de polyacrylamide

La technique utilisée est celle décrite par Sambrook (Sambrook *et al.* 1989). Le gel est constitué d'un gel de séparation d'environ 12 cm polymérisé sous 1 ml de butanol saturé en

eau, surmonté d'un gel de concentration de 3 cm. La composition des différents gels de polyacrylamide est décrite dans le tableau 6.

Tableau 6 : Composition des différents gels SDS utilisés au cours de cette thèse.

	Gel de concentration 4%	Gel de séparation à concentration constante	
		12,5%	10%
Polyacrylamide 40%	1mL	9,3 mL	7,5 mL
Tris-HCl 1M pH 6,8	2,5 mL	-	-
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	-	9 mL	9 mL
SDS 20% (p/v)	50 µL	150 µL	150 µL
Qsp H ₂ O	10 mL	30 mL	30 mL
APS 10% (p/v)	50 µL	150 µL	150 µL
TEMED	10 µL	15 µL	15 µL

La séparation des protéines est effectuée à 80 Volts pendant l'entrée des protéines dans le gel de concentration (20 minutes) afin d'éviter un effet de diffusion, le reste de l'électrophorèse étant effectuée sur la nuit à 60 Volts constants. Le tampon d'électrophorèse est explicité dans le tableau 7.

Tableau 7 : Composition du tampon utilisé pour l'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes.

Tampon électrophorèse SDS	
Tris	25 mM
Glycine	200 mM
SDS (p/v)	0,1 %
Qsp H ₂ O	1 L

c) Visualisation des protéines après électrophorèse

Après électrophorèse, les gels sont colorés par différentes techniques. Quelle que soit la méthode de coloration utilisée, les différentes étapes s'effectuent à température ambiante et sous agitation

i. -Coloration au bleu colloïdal

La coloration au bleu colloïdal est moins sensible que la coloration au nitrate d'argent. Elle possède cependant l'avantage d'être compatible avec des analyses en spectrométrie de masse. Dans notre cas l'intérêt réside surtout dans le fait de pouvoir observer des profils ainsi que des bandes de manière à pouvoir quantifier ces bandes. Les solutions nécessaires sont regroupées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Composition des tampons utilisés pour la coloration des protéines au bleu colloïdal.

Solution de fixation	Ethanol 50% (v/v) Acide phosphorique 2% (v/v)
Solution de lavage	Acide phosphorique 2% (v/v)
Solution de sensibilisation	Ethanol 17% (v/v) Acide phosphorique 2% (v/v) Sulfate d'ammonium 15% (v/v)
Solution de coloration	Ethanol 17% (v/v) Acide phosphorique 2% (v/v) Sulfate d'ammonium 15% (v/v) Brillant blue G-250 0.1% (p/v)
Solution de décoloration	Eau distillée
Solution de conservation	Acide acétique 1%

Le gel est tout d'abord fixé pendant 1 heure dans une solution de fixation. Cette solution est renouvelée pour 1 heure de fixation supplémentaire. Le gel est ensuite incubé 1 heure dans une solution de lavage, 20 minutes dans une solution de sensibilisation puis coloré jusqu'à

obtention de la coloration voulue. Le gel est ensuite lavé plusieurs fois avec de l'eau MilliQ afin d'éliminer le bruit de fond présent sur le gel.

ii. -Coloration au Kang Coomassie

La coloration au Kang coomassie présente l'avantage d'être une méthode de coloration quantitative, très rapide et très simple. Après migration des protéines, le gel est récupéré puis lavé 3 fois 10 minutes avec de l'eau MilliQ. Une fois lavé, le gel est ensuite incubé au minimum 1 heure dans la solution de coloration. Au bout d'une heure, les bandes sont visibles. Cependant, le gel peut être incubé sur la nuit puis lavé 3 fois 10 minutes avec de l'eau MilliQ afin d'enlever le bruit de fond avant d'être analysé.

iii. Coloration au nitrate d'argent

Les solutions utilisées pour la coloration au nitrate d'argent basées sur le Kit Proteosilver™ SilverStain (Sigma) sont détaillées dans le tableau 9.

Tableau 9: Composition des différentes solutions utilisées pour la coloration au nitrate d'argent

Nom	Composition
Solution de fixation	Ethanol 50% Acide Acétique 10%
Solution de sensibilisation	1% Sensitizer Proteosilver
Solution de coloration	1% Silver proteosilver
Solution de révélation	5% Developer Proteosilver 1 0.1% Developer Proteosilver 2

Ce kit de coloration à l'argent permet une coloration sensible des protéines et présente l'avantage d'être rapide d'utilisation en supprimant les étapes à l'obscurité. Après la

séparation des protéines sur gel de polyacrylamide, celui-ci est lavé dans de l'eau MilliQ pendant 2 minutes. Le gel est ensuite incubé dans 100 ml de solution de fixation pendant 20 minutes. Le gel est lavé une première fois dans 100 ml d'une solution à 30% d'éthanol pendant 10 minutes puis une seconde fois dans 200 ml d'eau MilliQ. Le gel est ensuite incubé 10 minutes dans 100 ml de solution de sensibilisation. Le gel est ensuite lavé 2 fois dans 200 ml d'eau MilliQ pendant 10 minutes. Le gel est ensuite incubé dans 100 ml de solution de coloration pendant 10 minutes avant d'être lavé 1 minute et trente secondes dans 200 ml d'eau MilliQ. Pour finir, le gel est incubé dans la solution de révélation jusqu'à obtenir la coloration désirée (3 à 10 minutes). La réaction est arrêtée par l'ajout de 5 ml de solution stop dans la solution de révélation.

d) Quantification des bandes protéiques

Une fois la coloration faite, le gel est scanné puis analysé avec le logiciel imageJ v1.48 (NIH, USA). L'intensité de chacune des bandes est mesurée ce qui permet de déterminer un ratio pour lequel nous avons la quantité de protéines encapsulées/quantité de protéines au départ. Ce calcul nous permet d'obtenir une valeur relative de l'encapsulation (exprimée en %) qui peut être facilement comparée aux autres valeurs obtenues dans la littérature.

B/ Quantification des protéines encapsulées

La quantification de l'encapsulation a été effectuée en présence de Protéinase K. Une solution de protéinase K est préparée à 1mg/ml dans de l'eau Milli-Q. Des solutions de ribonucléase A et de catalase sont préparées à 1 mg/ml. 50 µl de catalase et de ribonucléase sont incubés dans deux solutions indépendantes de 1 ml de coacervats. Après avoir effectué la transition en vésicules, 5 µL de protéinase K ont été ajoutés à la solution des vésicules puis incubés 1 heure à 37°C sous agitation. A la fin du temps d'incubation 100 µL de protéines sont solubilisés dans 100 µL de tampon Laemmli 2X pendant 20 minutes à température ambiante. Les

échantillons sont ensuite chauffés à 100°C pendant 2 minutes avant que 20 µL de chacun des échantillons soit déposés sur gel de polyacrylamide. Après migration des protéines, celle-ci sont révélées en présence de Kang Coomassie. La quantification des protéines est réalisée par mesure de l'intensité des différentes bandes en utilisant le logiciel ImageJ (NIH, USA).

5) Réactions enzymatiques

A/ La glucose oxydase

La réaction enzymatique faisant intervenir la glucose oxydase a été effectuée en incubant 50 µL d'une solution de glucose oxydase à 2 mg/ml, 10 µL d'une solution de Glucose 1M et de 10 µL d'une solution de résazurine à 1mg/ml (Sigma Aldrich, réf : R7017) dans 1 ml d'une solution de coacervats. Après une heure d'incubation, l'échantillon est déposé entre lame et lamelle et observé au microscope à épifluorescence. Afin de réaliser la courbe de Michaelis-Menten de la glucose oxydase à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules, nous avons réalisé huit échantillons composés de 50 µL d'une solution de glucose oxydase à 2 mg/ml, de 10 µL d'une solution de résazurine à 1mg/ml et de huit concentrations différentes en glucose (0mM, 5mM, 10mM, 15mM, 30mM, 50mM, 70mM et 90mM) dans 1ml final d'une solution de coacervats. Nous avons ensuite effectué la transition en vésicules en ajoutant 10 µL d'HCl 1N. Nous avons ensuite mesuré la fluorescence émise par la résorufine en diluant 10 µL de la solution de vésicules dans 990 µL d'éthanol toutes les 5 minutes. Les valeurs des pentes des vitesses initiales des courbes $Abs=f([substrat])$ obtenues pour chacune des concentrations en glucose sont mesurées et permettent d'obtenir une courbe de Michaelis-Menten $V= f(S)$. La représentation linéarisée de Lineweaver-Burk $1/V= f(1/S)$ est obtenue en calculant l'inverse des valeurs obtenues pour la courbe de Michaelis-Menten.

B/ La Phosphatase alcaline

10 µL d'une solution à 1mg/ml de phosphatase alcaline sont ajoutés à une solution de 1 ml de coacervats. Après séparation des deux phases, 2 µL d'une solution à 0.5 mg/ml de méthyl fluorescéine Phosphate (Sigma-Aldrich, réf : M2629) sont mélangés à 1 ml de chacune des phases. Après 15 minutes d'incubation à 32 °C, la fluorescence de chacune des phases est quantifiée et les échantillons photographiés. Dans le cas de la chaîne de réaction impliquant la glucose oxydase ainsi que la phosphatase alcaline, 2µL d'une solution de phosphatase alcaline à 2mg/ml ainsi que 10 µL d'une solution de Glucose-6-phosphate (Sigma-Aldrich, réf : G7879) à la place du glucose sont rajoutés dans une solution de coacervats contenant 50 µL d'une solution de glucose oxydase à 2 mg/ml et de 10 µL d'une solution de résazurine à 1mg/ml. Les échantillons sont ensuite incubés 5 minutes à 30°C avant que la transition en vésicules soit effectuée comme décrit précédemment. Après 2 heures d'incubation à 35°C, le signal de fluorescence de la résorufine est quantifié.

C/ La horse radish peroxydase

Une solution de horse radish peroxydase (Sigma Aldrich, réf : P8375) à 1 mg/ml est préparée. L'échantillon est ensuite incubé 1 heure à 30°C. Les phases d'acides gras et aqueuses sont séparées par centrifugation 15 minutes à 1000g. 1 ml de chaque phase est récupéré avant d'être incubé avec 1 µL d'une solution d'H₂O₂ (Sigma-Aldrich, réf : H1009) et 2 µL d'une solution d'ampliflured à 5mg/ml (Sigma-Aldrich réf : 90101). Après 2 heures d'incubation à 30°C, la quantité de résorufine formée dans les deux phases comme témoin de la réaction est mesurée par fluorescence.

D/ Lactate déshydrogénase

a) Protéine commerciale

Une solution de lactate déshydrogénase (Sigma, réf : 10 127 876 001) est préparée dans un tampon (Tris 20 mM, NaCl 200 mM pH 7.4) à 1mg/ml. Une solution de NADH à 5 mg/ml est préparée dans l'eau ainsi qu'une solution de pyruvate à 10mg/ml dans l'eau. Deux échantillons sont préparés. Dans le premier, 5 μ L de la solution de lactate déshydrogénase sont prélevés et incubés dans 1 ml d'une solution de coacervats en présence de 20 μ L de NADH (0.15mM final) et de 10 μ L de pyruvate (1mM final). Dans le second échantillon, 5 μ L de la solution de Lactate déshydrogénase sont prélevés et incubés dans un second tampon (Tris 20 mM, NaCl 200 mM pH 9) en présence de 20 μ L de NADH (0.15mM final) et de 10 μ L de pyruvate (1mM final). Les échantillons sont incubés à 32°C, les mesures d'absorbance étant effectuées à 340 nm chaque minute pendant 10 minutes.

b) Protéine de *Spiroplasma citri*

i. Mesure de fluorescence

Les échantillons de bactéries sont préparés comme décrit précédemment. Une solution de 5 mg/ml de NAD est préparée dans l'eau. Une solution de lactate à 10 mg/ml est ensuite préparée. 10 μ L de la solution de bactéries sont incubés dans une solution de 1 ml de coacervats en présence de 20 μ L de NAD, de 50 μ L de lactate et de 10 μ L d'une solution de résazurine à 1mg/ml. La solution est ensuite incubée 1 heure à 37°C. Les échantillons sont ensuite observés par microscopie à épifluorescence.

ii. Mesure de l'absorbance à 340 nm

Les mesures de vitesses de réactions à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules sont effectuées par mesure de l'absorbance à 340 nm. Afin de réaliser la courbe de Michaelis-Menten, différentes concentrations en pyruvate sont testées à partir d'une solution à 10mg/ml (0 mM

; 0.2 mM ; 0.5 mM ; 1 mM ; 2 mM ; 5 mM ; 10 mM). Pour chacune des concentrations en pyruvate, deux échantillons sont préparés. Dans le premier échantillon, 10 μ L d'une solution de protéines de bactéries sont incubées en présence de 20 μ L de la solution de NADH à 5mg/ml (0.15 mM final) ainsi que du pyruvate dans 1 ml de coacervats. Dans le second échantillon, les coacervats sont transformés en vésicules en ajoutant 10 μ L d'une solution d'HCl 1N. Une fois la transition effectuée, 10 μ L de protéines ainsi que 20 μ L de NADH et le pyruvate sont ajoutés à la solution de vésicules. Pour chaque concentration en pyruvate, une courbe Abs= f (temps) est obtenue par mesure de l'absorbance de l'échantillon toutes les minutes pendant 15 minutes. La courbe de Michaelis-Menten Vitesse= f([pyruvate]) est alors effectuée comme décrit précédemment.

E/ **Mesure de l'activité glycolytique**

a) *Mesure de l'absorbance à 340 nm*

L'activité glycolytique est mesurée *via* la catalyse du glyceraldéhyde-3-phosphate en glycérate-1,3-diphosphate par la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. Le NADH formé est titré par la résazurine ou par la mesure de l'absorbance à 340 nm. Des solutions de NAD à 1 mg/ml ainsi que d'ATP à 1 mg/ml sont préparées dans de l'eau MilliQ. Une solution de Glucose-6-phosphate 1M est aussi préparée dans l'eau MilliQ. 10 μ L d'une solution de bactéries sont incubés dans 1 ml d'une solution de coacervats en présence de 30 μ L de la solution de NAD, 30 μ L de la solution d'ATP ainsi que 5 μ L de la solution de glucose-6-phosphate. La transition en vésicule est effectuée comme décrite précédemment. La mesure de l'absorbance à 340 nm est effectuée après une heure d'incubation à 32°C par dilution $\frac{1}{2}$ du mélange réactionnel dans de l'éthanol.

b) Mesure de la fluorescence

La préparation des échantillons est effectuée comme décrit précédemment. Lors de l'incubation dans les coacervats, 10 μL d'une solution de résazurine à 1 mg/ml sont ajoutés avant d'effectuer la transition en vésicules. Après une heure d'incubation à 32°C l'échantillon est observé au microscope à épifluorescence.

Bibliographie

Bibliographie

- Ainalem, M.-L., Bartles, A., Muck, J., Dias, R.S., Carnerup, A.M., Zink, D., et Nylander, T. (2014). DNA Compaction Induced by a Cationic Polymer or Surfactant Impact Gene Expression et DNA Degradation. *PLOS ONE* 9, e92692.
- André, A., Maccheroni, W., Doignon, F., Garnier, M., et Renaudin, J. (2003). Glucose et trehalose PTS permeases of *Spiroplasma citri* probably share a single IIA domain, enabling the spiroplasma to adapt quickly to carbohydrate changes in its environment. *Microbiology* 149, 2687–2696.
- André, A., Maucourt, M., Moing, A., Rolin, D., et Renaudin, J. (2005). Sugar import et phytopathogenicity of *Spiroplasma citri*: glucose et fructose play distinct roles. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 18, 33–42.
- Apel, C.L., Deamer, D.W., et Mautner, M.N. (2002). Self-assembled vesicles of monocarboxylic acids et alcohols: conditions for stability et for the encapsulation of biopolymers. *Biochim Biophys Acta* 1559, 1–9.
- Bangham, A.S., MM. Watkins, J.C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.*
- Baret, J.-C., Miller, O.J., Taly, V., Ryckelynck, M., El-Harrak, A., Frenz, L., Rick, C., Samuels, M.L., Hutchison, J.B., Agresti, J.J., Link, D., Weitz, D.A., et Griffiths, A.D. (2009). Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity. *Lab Chip* 9, 1850–1858.
- Baumberger, J.P., Jürgensen, J.J., et Bardwell, K. (1933). THE COUPLED REDOX POTENTIAL OF THE LACTATE-ENZYME-PYRUVATE SYSTEM. *J. Gen. Physiol.* 16, 961–976.
- Beneyton, T., Coldren, F., Baret, J.-C., Griffiths, A.D., et Taly, V. (2014). CotA laccase: high-throughput manipulation et analysis of recombinant enzyme libraries expressed in *E. coli* using droplet-based microfluidics. *Analyst* 139, 3314–3323.
- Bhattacharya, S., et Mandal, S.S. (1997). Interaction of surfactants with DNA. Role of hydrophobicity et surface charge on intercalation et DNA melting. *Biochim. Biophys. Acta* 1323, 29–44.
- Binks, B.P., et Murakami, R. (2006). Phase inversion of particle-stabilized materials from foams to dry water. *Nat Mater* 5, 865–869.
- Blagbrough, I.S., Geall, A.J., et Neal, A.P. (2003). Polyamines et novel polyamine conjugates interact with DNA in ways that can be exploited in non-viral gene therapy. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 397–406.
- Boarer, C.D., Read, W.C., et Read, J.J. (1971). Estimation of the growth of the T 1 strain of *Mycoplasma mycoides* in tryptose broth by the measurement of lactate dehydrogenase. I. *Method. Appl. Microbiol.* 22, 763–768.
- Bordier, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256, 1604–1607.

Bric, J.M., Bostock, R.M., et Silverstone, S.E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 535–538.

Bull, H.B., et Breese, K. (1967). Denaturation of proteins by fatty acids. *Arch Biochem Biophys* 120, 309–315.

Bungenberg De Jong, H.K., HR. (1929). *Proc Secf Sci K Ned Akad.*

Bungenberg De Jong, et Kruyt (1949). *Colloïd Sci.*

Carle, P., Saillard, C., Carrère, N., Carrère, S., Duret, S., Eveillard, S., Gaurivaud, P., Gourgues, G., Gouzy, J., Salar, P., Verdin, E., Breton, M., Blanchard, A., Laigret, F., Bové, JM., Renaudin, J., et Foissac, X.. (2010). Partial chromosome sequence of *Spiroplasma citri* reveals extensive viral invasion et important gene decay. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3420–3426.

Carmona-Ribeiro, A.M., et Chaimovich, H. (1986). Salt-induced aggregation et fusion of dioctadecyldimethylammonium chloride et sodium dihexadecylphosphate vesicles. *Biophys. J.* 50, 621–628.

Carreras, P., Elani, Y., Law, R.V., Brooks, N.J., Seddon, J.M., et Ces, O. (2015). A microfluidic platform for size-dependent generation of droplet interface bilayer networks on rails. *Biomicrofluidics* 9, 064121.

Casadevall i Solvas, X., et deMello, A. (2011). Droplet microfluidics: recent developments et future applications. *Chem Commun Camb* 47, 1936–1942.

Caschera, F., et Noireaux, V. (2014a). Integration of biological parts toward the synthesis of a minimal cell. *Curr Opin Chem Biol* 22, 85–91.

Caschera, F., et Noireaux, V. (2014b). Synthesis of 2.3 mg/ml of protein with an all *Escherichia coli* cell-free transcription–translation system. *Biochimie* 99, 162–168.

Caschera, F., et Noireaux, V. (2016). Compartmentalization of an all-*E. coli* Cell-Free Expression System for the Construction of a Minimal Cell. *Artif. Life* 22, 185–195.

Catherine, C., Lee, K.-H., Oh, S.-J., et Kim, D.-M. (2013). Cell-free platforms for flexible expression et screening of enzymes. *Biotechnol. Adv.* 31, 797–803.

Cayre, R.O., Bayol, A.P., Obregon, R., et Alday, L.E. (2013). A unique aortic arterial meshwork with a major aortopulmonary collateral artery, a major arteriovenous collateral artery, et a coronary arteriovenous fistula in a young man with a bicuspid aortic valve. *Pediatr Cardiol* 34, 2017–2020.

Cech, T.R. (1989). RNA chemistry. Ribozyme self-replication? *Nature* 339, 507–508.

Charlebois, R.L., et Doolittle, W.F. (2004). Computing prokaryotic gene ubiquity: rescuing the core from extinction. *Genome Res.* 14, 2469–2477.

Chen, I.A., et Szostak, J.W. (2004). A kinetic study of the growth of fatty acid vesicles. *Biophys J* 87, 988–998.

Chen, J., et Chang, C.J. (1994). The osmotic lysis of *Spiroplasma* cells et its use in enzyme studies. *Can. J. Microbiol.* 40, 791–794.

- Cistola, D.P., Atkinson, D., Hamilton, J.A., et Small, D.M. (1986). Phase behavior et bilayer properties of fatty acids: hydrated 1:1 acid-soaps. *Biochemistry (Mosc.)* 25, 2804–2812.
- Cistola, D.P., Hamilton, J.A., Jackson, D., et Small, D.M. (1988). Ionization et phase behavior of fatty acids in water: application of the Gibbs phase rule. *Biochemistry (Mosc.)* 27, 1881–1888.
- Clausen, J. (1969). Lactate dehydrogenase isoenzymes of sperm cells et tests. *Biochem. J.* 111, 207–218.
- Colletier, J.P., Chaize, B., Winterhalter, M., et Fournier, D. (2002). Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein et phospholipid bilayer. *BMC Biotechnol* 2, 9.
- Courtois, F., Olguin, L.F., Whyte, G., Bratton, D., Huck, W.T., Abell, C., et Hollfelder, F. (2008). An integrated device for monitoring time-dependent in vitro expression from single genes in picolitre droplets. *Chembiochem* 9, 439–446.
- Daube, S.S., et Bar-Ziv, R.H. (2013). Protein nanomachines assembly modes: cell-free expression et biochip perspectives. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 5, 613–628.
- Deasy, P.B., et O’Connell, M.J. (1984). Correlation of surface characteristics with ease of production et in vitro release of sodium salicylate from various enteric coated microcapsules prepared by pan coating. *J Microencapsul* 1, 217–227.
- Delincé, M.J., Bureau, J.-B., López-Jiménez, A.T., Cosson, P., Soldati, T., et McKinney, J.D. (2016). A microfluidic cell-trapping device for single-cell tracking of host-microbe interactions. *Lab. Chip* 16, 3276–3285.
- Dewey, D.C., Strulson, C.A., Cacace, D.N., Bevilacqua, P.C., et Keating, C.D. (2014). Bioreactor droplets from liposome-stabilized all-aqueous emulsions. *Nat Commun* 5, 4670.
- Dinsmore, A.D., Hsu, M.F., Nikolaidis, M.G., Marquez, M., Bausch, A.R., et Weitz, D.A. (2002). Colloidosomes: selectively permeable capsules composed of colloidal particles. *Science* 298, 1006–1009.
- Discher, D.E., et Eisenberg, A. (2002). Polymer Vesicles. *Science* 297, 967–973.
- Dittrich, P.S., Jahnz, M., et Schwille, P. (2005). A new embedded process for compartmentalized cell-free protein expression et on-line detection in microfluidic devices. *Chembiochem* 6, 811–814.
- Dolatmoradi, A., et El-Zahab, B. (2016). Thermally-assisted ultrasonic separation of giant vesicles. *Lab. Chip* 16, 3449–3453.
- Dora Tang, T.Y., Rohaida Che Hak, C., Thompson, A.J., Kuimova, M.K., Williams, D.S., Perriman, A.W., et Mann, S. (2014). Fatty acid membrane assembly on coacervate microdroplets as a step towards a hybrid protocell model. *Nat Chem* 6, 527–533.
- Dora Tang TY, van S.D., deMello A, Ross Anderson JL, Mann S. (2015). In vitro gene expression within membrane-free coacervate protocells. *Nat. Chem.*
- Doughty, M.J. (1998). Some kinetic properties of lactate dehydrogenase activity in cell extracts from a mammalian (ovine) corneal epithelium. *Exp. Eye Res.* 66, 231–239.

Douliez, J.P., Houinsou-Houssou, B., Fameau, A.L., Novales, B., et Gaillard, C. (2010). Self assembly of anastomosis-like superstructures in fatty acid/guanidine hydrochloride aqueous dispersions. *J Colloid Interface Sci* 341, 386–389.

Douliez, J.P., Houssou, B.H., Fameau, A.L., Navailles, L., Nallet, F., Grelard, A., Dufourc, E.J., et Gaillard, C. (2016). Self-Assembly of Bilayer Vesicles Made of Saturated Long Chain Fatty Acids. *Langmuir* 32, 401–410.

D'Souza, S.F. (2001). Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 16, 337–353.

Eigen, M. (1992). *Steps towards life*. Oxf. Univ. Press 113–114.

Elani, Y., Law, R.V., et Ces, O. (2014). Vesicle-based artificial cells as chemical microreactors with spatially segregated reaction pathways. *Nat. Commun.* 5, 5305.

Elani, Y., Law, R.V., et Ces, O. (2015). Protein synthesis in artificial cells: using compartmentalisation for spatial organisation in vesicle bioreactors. *Phys Chem Chem Phys* 17, 15534–15537.

Emmen, F., et Storm, G. (1987). Liposomes in treatment of infectious diseases. *Pharm. Weekbl. Sci.* 9, 162–171.

Ercińska, M., Deas, J., et Silver, I.A. (1995). The effect of pH on glycolysis et phosphofructokinase activity in cultured cells et synaptosomes. *J. Neurochem.* 65, 2765–2772.

Evan Spruijt, J.S., Martien A. Cohen Stuart Jasper van der Gucht (2010). Interfacial tension between a complex coacervate phase et its coexisting aqueous phase.

Everse, J., et Kaplan, N.O. (1973). Lactate dehydrogenases: structure et function. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 37, 61–133.

Fameau, A.L., Houinsou-Houssou, B., Ventureira, J.L., Navailles, L., Nallet, F., Novales, B., et Douliez, J.P. (2011). Self-assembly, foaming, et emulsifying properties of sodium alkyl carboxylate/guanidine hydrochloride aqueous mixtures. *Langmuir* 27, 4505–4513.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., et Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7413–7417.

Friddin, M.S., Morgan, H., et de Planque, M.R.R. (2013). Cell-free protein expression systems in microdroplets: Stabilization of interdroplet bilayers. *Biomicrofluidics* 7.

Gebicki, J.M., et Hicks, M. (1973). Ufasomes are stable particles surrounded by unsaturated fatty acid membranes. *Nature* 243, 232–234.

Gennis, R. (1989). *Biomembrane : structure et fonction*.

Gibson, D.G., Glass, J.I., Lartigue, C., Noskov, V.N., Chuang, R.Y., Algire, M.A., Benders, G.A., Montague, M.G., Ma, L., Moodie, M.M., et al. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 329, 52–56.

Gil, R.J. (2011). Minimal cell. *Encycl. Astrobiol.* 1065–1066.

- Glass, J.I., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Yooseph, S., Lewis, M.R., Maruf, M., Hutchison, C.A., Smith, H.O., et Venter, J.C. (2006). Essential genes of a minimal bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 425–430.
- Goparaju, G.N., Satishchandran, C., et Gupta, P.K. (2009). The effect of the structure of small cationic peptides on the characteristics of peptide-DNA complexes. *Int. J. Pharm.* *369*, 162–169.
- Gould, B.S. (1968). Collagen biosynthesis at the ribosomal level. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* *4*, 33–65.
- Gregoriadis, G.R., BE. (1972). Lysosomal localization of -fructofuranosidase-containing liposomes injected into rats. *Biochem. J.*
- Hanczyc, M.M., Fujikawa, S.M., et Szostak, J.W. (2003). Experimental models of primitive cellular compartments: encapsulation, growth, et division. *Science* *302*, 618–622.
- Hargreaves, W.R., et Deamer, D.W. (1978). Liposomes from ionic, single-chain amphiphiles. *Biochemistry (Mosc.)* *17*, 3759–3768.
- He, J., Liu, Y., Babu, T., Wei, Z., et Nie, Z. (2012). Self-assembly of inorganic nanoparticle vesicles et tubules driven by tethered linear block copolymers. *J Am Chem Soc* *134*, 11342–11345.
- Heo, J., Thomas, K.J., Seong, G.H., et Crooks, R.M. (2003). A microfluidic bioreactor based on hydrogel-entrapped *E. coli*: cell viability, lysis, et intracellular enzyme reactions. *Anal. Chem.* *75*, 22–26.
- Heyman, Y., Buxboim, A., Wolf, S.G., Daube, S.S., et Bar-Ziv, R.H. (2012). Cell-free protein synthesis et assembly on a biochip. *Nat. Nanotechnol.* *7*, 374–378.
- Hillebrecht, J.R., et Chong, S. (2008). A comparative study of protein synthesis in in vitro systems: from the prokaryotic reconstituted to the eukaryotic extract-based. *BMC Biotechnol* *8*, 58.
- Hong-Brown, L.Q., Frost, R.A., et Lang, C.H. (2001). Alcohol Impairs Protein Synthesis et Degradation in Cultured Skeletal Muscle Cells. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *25*, 1373–1382.
- Horbaschek, K., Hoffmann, H., et Thunig, C. (1998). Formation et Properties of Lamellar Phases in Systems of Cationic Surfactants et Hydroxy-Naphthoate. *J Colloid Interface Sci* *206*, 439–456.
- Hu, P.C., Li, S., et Malmstadt, N. (2011). Microfluidic fabrication of asymmetric giant lipid vesicles. *ACS Appl Mater Interfaces* *3*, 1434–1440.
- Huang, X., Li, M., Green, D.C., Williams, D.S., Patil, A.J., et Mann, S. (2013). Interfacial assembly of protein-polymer nano-conjugates into stimulus-responsive biomimetic protocells. *Nat Commun* *4*, 2239.
- Huang, X., Patil, A.J., Li, M., et Mann, S. (2014). Design et Construction of Higher-Order Structure et Function in Proteinosome-Based Protocells. *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 9225–9234.
- Husale, S., Grange, W., Karle, M., Bürgi, S., et Hegner, M. (2008). Interaction of cationic surfactants with DNA: a single-molecule study. *Nucleic Acids Res.* *36*, 1443–1449.

- Hutchison, C.A., 3rd, Chuang, R.Y., Noskov, V.N., Assad-Garcia, N., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Gill, J., Kannan, K., Karas, B.J., Ma, L., et al. (2016). Design et synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* *351*, aad6253.
- Ishikawa, K., Sato, K., Shima, Y., Urabe, I., et Yomo, T. (2004). Expression of a cascading genetic network within liposomes. *FEBS Lett* *576*, 387–390.
- Juhas, M., Eberl, L., et Glass, J.I. (2011). Essence of life: essential genes of minimal genomes. *Trends Cell Biol* *21*, 562–568.
- Kalantar, T.H., Tucker, C.J., Zalusky, A.S., Boomgaard, T.A., Wilson, B.E., Ladika, M., Jordan, S.L., Li, W.K., Zhang, X., et Goh, C.G. (2007). High throughput workflow for coacervate formation et characterization in shampoo systems. *J Cosmet Sci* *58*, 375–383.
- Kalur, G.C., et Raghavan, S.R. (2005). Anionic wormlike micellar fluids that display cloud points: rheology et phase behavior. *J Phys Chem B* *109*, 8599–8604.
- Kapakoglou, N.I., Giokas, D.L., Tsogas, G.Z., et Vlessidis, A.G. (2008). Coacervation of surface-functionalized polymerized vesicles derived from ammonium bromide surfactants. Application to the selective speciation of chromium in environmental samples. *Anal Chem* *80*, 9787–9796.
- Katz, E. (1971). Biosynthesis of polypeptide antibiotics. *Pure Appl. Chem. Chim. Pure Appl.* *28*, 551–570.
- Kaye, S.B., et Richardson, V.J. (1979). Potential of liposomes as drug-carriers in cancer chemotherapy: a review. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *3*, 81–85.
- Kayes, J.B. (1977). Pharmaceutical suspensions: relation between zeta potential, sedimentation volume et suspension stability. *J Pharm Pharmacol* *29*, 199–204.
- Kim, K.T., Cornelissen, J.J.L.M., Nolte, R.J.M., et van Hest, J.C.M. (2009). A Polymersome Nanoreactor with Controllable Permeability Induced by Stimuli-Responsive Block Copolymers. *Adv. Mater.* *21*, 2787–2791.
- Kita, H., Matsuura, T., Sunami, T., Hosoda, K., Ichihashi, N., Tsukada, K., Urabe, I., et Yomo, T. (2008). Replication of genetic information with self-encoded replicase in liposomes. *Chembiochem* *9*, 2403–2410.
- Kizilay, E., Kayitmazer, A.B., et Dubin, P.L. (2011). Complexation et coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. *Adv. Colloid Interface Sci.* *167*, 24–37.
- Klein, R.T., D. Kunz, W. (2008). Choline carboxylate surfactants: biocompatible et highly soluble in water. *Green Chem.*
- Koga, S., Williams, D.S., Perriman, A.W., et Mann, S. (2011). Peptide-nucleotide microdroplets as a step towards a membrane-free protocell model. *Nat Chem* *3*, 720–724.
- Koshland, D.E., Jr. (2002). The seven pillars of life. *Science* *295*, 1463.
- Kumar, M., Grzelakowski, M., Zilles, J., Clark, M., et Meier, W. (2007). Highly permeable polymeric membranes based on the incorporation of the functional water channel protein Aquaporin Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20719–20724.

- Kumar, R.K., Li, M., Olof, S.N., Patil, A.J., et Mann, S. (2013). Artificial cytoskeletal structures within enzymatically active bio-inorganic protocells. *Small* 9, 357–362.
- Kurihara, K., Tamura, M., Shohda, K., Toyota, T., Suzuki, K., et Sugawara, T. (2011). Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA. *Nat Chem* 3, 775–781.
- Kuruma, Y., Stano, P., Ueda, T., et Luisi, P.L. (2009). A synthetic biology approach to the construction of membrane proteins in semi-synthetic minimal cells. *Biochim Biophys Acta* 1788, 567–574.
- Lartigue, C., Glass, J.I., Alperovich, N., Pieper, R., Parmar, P.P., Hutchison, C.A., 3rd, Smith, H.O., et Venter, J.C. (2007). Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* 317, 632–638.
- Lazcano, A., et Bada, J.L. (2003). The 1953 Stanley L. Miller experiment: fifty years of prebiotic organic chemistry. *Orig Life Evol Biosph* 33, 235–242.
- Li, M.G., DC. Anderson, JLR. Binks, BP. Mann, S. (2011). In vitro gene expression et enzyme catalysis in bio-organic protocells. *Chem Sci* 1739–1745.
- Li, D., Kelkar, M.S., et Wagner, N.J. (2012). Phase Behavior et Molecular Thermodynamics of Coacervation in Oppositely Charged Polyelectrolyte/Surfactant Systems: A Cationic Polymer JR 400 et Anionic Surfactant SDS Mixture. *Langmuir* 28, 10348–10362.
- Li, M., Huang, X., et Mann, S. (2014). Spontaneous growth et division in self-reproducing inorganic colloidosomes. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 10, 3291–3298.
- Linton, B., et Hamilton, A.D. (1999). Calorimetric investigation of guanidinium-carboxylate interactions. *Tetrahedron* 55, 6027–6038.
- Liu, X., Zhou, P., Huang, Y., Li, M., Huang, X., et Mann, S. (2016). Hierarchical Proteinosomes for Programmed Release of Multiple Components. *Angew Chem Int Ed Engl* 55, 7095–7100.
- Luisi, P.L., Rasi, P.S., et Mavelli, F. (2004). A possible route to prebiotic vesicle reproduction. *Artif Life* 10, 297–308.
- Ma, W., et Hu, J. (2012). Computer simulation on the cooperation of functional molecules during the early stages of evolution. *PLoS One* 7, e35454.
- Ma, W., Yu, C., Zhang, W., Zhou, P., et Hu, J. (2010). The emergence of ribozymes synthesizing membrane components in RNA-based protocells. *Biosystems* 99, 201–209.
- Mandel, M., et Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 159–162.
- Manohar, C. (2003). Mechanism of the clouding phenomenon on surfactant solutions. *Surfactants Solut.*
- Mansy, S.S., Schrum, J.P., Krishnamurthy, M., Tobe, S., Treco, D.A., et Szostak, J.W. (2008). Template-directed synthesis of a genetic polymer in a model protocell. *Nature* 454, 122–125.
- Marguet, M., Bonduelle, C., et Lecommandoux, S. (2013). Multicompartmentalized polymeric systems: towards biomimetic cellular structure et function. *Chem. Soc. Rev.* 42, 512–529.

- Mayya, K.S., Bhattacharyya, A., et Argillier, J.-F. (2003). Micro-Encapsulation by Complex Coacervation: Influence of Surfactant.
- McLean, L.R., et Phillips, M.C. (1981). Mechanism of cholesterol et phosphatidylcholine exchange or transfer between unilamellar vesicles. *Biochemistry (Mosc.)* 20, 2893–2900.
- Minami, H., Inoue, T., et Shimozawa, R. (1996). Beryllium Ion Can Induce the Aggregation of Phosphatidylcholine Vesicles. *Langmuir* 12, 3574–3579.
- Miyata, H., Nishiyama, S., Akashi, K., et Kinosita, K., Jr. (1999). Protrusive growth from giant liposomes driven by actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U A* 96, 2048–2053.
- Monnard, P.A., Apel, C.L., Kanavarioti, A., et Deamer, D.W. (2002). Influence of ionic inorganic solutes on self-assembly et polymerization processes related to early forms of life: implications for a prebiotic aqueous medium. *Astrobiology* 2, 139–152.
- Morigaki, K.W., P. (2007). Fatty acid vesicles. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 75–80.
- Moya, A., Gil, R., Latorre, A., Pereto, J., Pilar Garcillan-Barcia, M., et de la Cruz, F. (2009). Toward minimal bacterial cells: evolution vs. design. *FEMS Microbiol Rev* 33, 225–235.
- Murtas, G. (2010). Internal lipid synthesis et vesicle growth as a step toward self-reproduction of the minimal cell. *Syst Synth Biol* 4, 85–93.
- Murtas, G. (2013). Early self-reproduction, the emergence of division mechanisms in protocells. *Mol Biosyst* 9, 195–204.
- Murtas, G., Kuruma, Y., Bianchini, P., Diaspro, A., et Luisi, P.L. (2007). Protein synthesis in liposomes with a minimal set of enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 12–17.
- Najah, M., Calbrix, R., Mahendra-Wijaya, I.P., Beneyton, T., Griffiths, A.D., et Drevelle, A. (2014). Droplet-based microfluidics platform for ultra-high-throughput bioprospecting of cellulolytic microorganisms. *Chem. Biol.* 21, 1722–1732.
- Namani, T., et Deamer, D.W. (2008). Stability of model membranes in extreme environments. *Orig Life Evol Biosph* 38, 329–341.
- Naraoka, H., Shimoyama, A., et Harada, K. (1999). Molecular distribution of monocarboxylic acids in Asuka carbonaceous chondrites from Antarctica. *Orig Life Evol Biosph* 29, 187–201.
- Nardin, C., Thoeni, S., Widmer, J., Winterhalter, M., et Meier, W. (2000). Nanoreactors based on (polymerized) ABA-triblock copolymer vesicles. *Chem. Commun.* 1433–1434.
- Noireaux, V., et Libchaber, A. (2004). A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proc Natl Acad Sci U A* 101, 17669–17674.
- Nomura, F., Inaba, T., Ishikawa, S., Nagata, M., Takahashi, S., Hotani, H., et Takiguchi, K. (2004). Microscopic observations reveal that fusogenic peptides induce liposome shrinkage prior to membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U A* 101, 3420–3425.
- Nomura, S.M., Tsumoto, K., Hamada, T., Akiyoshi, K., Nakatani, Y., et Yoshikawa, K. (2003). Gene expression within cell-sized lipid vesicles. *Chembiochem* 4, 1172–1175.

- Oberholzer, T., et Luisi, P.L. (2002). The use of liposomes for constructing cell models. *J Biol Phys* 28, 733–744.
- Oberholzer, T., Nierhaus, K.H., et Luisi, P.L. (1999). Protein expression in liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 238–241.
- Obermeyer, A.C., Mills, C.E., Dong, X.H., Flores, R.J., et Olsen, B.D. (2016). Complex coacervation of supercharged proteins with polyelectrolytes. *Soft Matter* 12, 3570–3581.
- Ohki, S., et Ohshima, H. (1999). Interaction et aggregation of lipid vesicles (DLVO theory versus modified DLVO theory). *Colloids Surf. B Biointerfaces* 14, 27–45.
- Ohno, M., Hamada, T., Takiguchi, K., et Homma, M. (2009). Dynamic behavior of giant liposomes at desired osmotic pressures. *Langmuir* 25, 11680–11685.
- Oparin, A. (1938). The origin of life.
- Osawa, M., et Erickson, H.P. (2013). Liposome division by a simple bacterial division machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11000–11004.
- Ostro, M.J., et Cullis, P.R. (1989). Use of liposomes as injectable-drug delivery systems. *Am. J. Hosp. Pharm.* 46, 1576–1587.
- Paddle, B.M. (1996). Biosensors for chemical et biological agents of defence interest. *Biosens. Bioelectron.* 11, 1079–1113.
- Pang, M., Cairns, A.J., Liu, Y., Belmabkhout, Y., Zeng, H.C., et Eddaoudi, M. (2013). Synthesis et integration of Fe-soc-MOF cubes into colloidosomes via a single-step emulsion-based approach. *J Am Chem Soc* 135, 10234–10237.
- Pautot, S., Frisken, B.J., et Weitz, D.A. (2003). Engineering asymmetric vesicles. *Proc Natl Acad Sci U A* 100, 10718–10721.
- Peters, R.J.R.W., Marguet, M., Marais, S., Fraaije, M.W., van Hest, J.C.M., et Lecommandoux, S. (2014). Cascade Reactions in Multicompartmentalized Polymersomes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 146–150.
- Pontani, L.L., van der Gucht, J., Salbreux, G., Heuvingh, J., Joanny, J.F., et Sykes, C. (2009). Reconstitution of an actin cortex inside a liposome. *Biophys J* 96, 192–198.
- Raghavan, S.R., and Kaler, E.W. (2001). Highly Viscoelastic Wormlike Micellar Solutions Formed by Cationic Surfactants with Long Unsaturated Tails. *Langmuir* 17, 300–306.
- Rawlings, A.E., Bramble, J.P., Walker, R., Bain, J., Galloway, J.M., et Staniland, S.S. (2014). Self-assembled MmsF proteinosomes control magnetite nanoparticle formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U A* 111, 16094–16099.
- Razin, S. (1992). Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicating prokaryotes. *FEMS Microbiol Lett* 100, 423–431.
- Rogerson, M.L., Robinson, B.H., Bucak, S., et Walde, P. (2006). Kinetic studies of the interaction of fatty acids with phosphatidylcholine vesicles (liposomes). *Colloids Surf B Biointerfaces* 48, 24–34.

- Ronsin, G., Perrin, C., Guédât, P., Kremer, A., Camilleri, P., et Kirby, A.J. (2001). Novel spermine-based cationic gemini surfactants for gene delivery. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 2234–2235.
- Rosenberg, R.D., N. (2013). Designing nanoparticle colloidal shells for selective transport. *Soft Matter* 143–148.
- Ruiz, J.R., S. Bendito, DP. (2006). Tetrabutylammonium-induced coacervation in vesicular solution of alkyl carboxylic acids for the extraction of organic compounds. *Anal Chem* 78, 7229–7239.
- Saito, H., Kato, Y., Le Berre, M., Yamada, A., Inoue, T., Yosikawa, K., et Baigl, D. (2009). Time-resolved tracking of a minimum gene expression system reconstituted in giant liposomes. *Chembiochem* 10, 1640–1643.
- Saito, T., Iwaki, T., et Yoshikawa, K. (2008). DNA compaction induced by neutral polymer is retarded more effectively by divalent anion than monovalent anion. *Chem. Phys. Lett.* 465, 40–44.
- Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R., et Endo, Y. (2002). A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14652–14657.
- Schaerli, Y., Wootton, R.C., Robinson, T., Stein, V., Dunsby, C., Neil, M.A., French, P.M., Demello, A.J., Abell, C., et Hollfelder, F. (2009). Continuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in microfluidic microdroplets. *Anal Chem* 81, 302–306.
- Schumacher, I., Arad, A., et Margalit, R. (1999). Butyrylcholinesterase formulated in liposomes. *Biotechnol Appl Biochem* 30(Pt 3), 225–230.
- Sessa, G., et Weissmann, G. (1970). Incorporation of lysozyme into liposomes. A model for structure-linked latency. *J Biol Chem* 245, 3295–3301.
- Shah, R.K., Kim, J.W., et Weitz, D.A. (2010). Monodisperse stimuli-responsive colloidosomes by self-assembly of microgels in droplets. *Langmuir* 26, 1561–1565.
- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., et Ueda, T. (2001). Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol* 19, 751–755.
- Shin, J., et Noireaux, V. (2010). Efficient cell-free expression with the endogenous E. Coli RNA polymerase et sigma factor 70. *J. Biol. Eng.* 4, 8.
- Shin, J., et Noireaux, V. (2012). An E. coli Cell-Free Expression Toolbox: Application to Synthetic Gene Circuits et Artificial Cells. *ACS Synth. Biol.* 1, 29–41.
- Shum, H.C., et Weitz, D.A. (2011). Multicompartment polymersome gel for encapsulation. *Soft Matter* 7, 8762–8765.
- Smith, J.M., et Szathmary, E. (1993). The origin of chromosomes. I. Selection for linkage. *J Theor Biol* 164, 437–446.
- Sokolova, E., Spruijt, E., Hansen, M.M., Dubuc, E., Groen, J., Chokkalingam, V., Piruska, A., Heus, H.A., et Huck, W.T. (2013). Enhanced transcription rates in membrane-free protocells formed by coacervation of cell lysate. *Proc Natl Acad Sci U A* 110, 11692–11697.
- Souza, T.S., P. Luisi, L. (2009). The Minimal Size of Liposome-Based Model Cells Brings about a Remarkably Enhanced Entrapment et Protein Synthesis. *Chembiochem* 10, 1056–1063.

Stano, P., et Luisi, P.L. (2013). Semi-synthetic minimal cells: origin et recent developments. *Curr Opin Biotechnol* 24, 633–638.

Sunami, T., Sato, K., Matsuura, T., Tsukada, K., Urabe, I., et Yomo, T. (2006). Femtoliter compartment in liposomes for in vitro selection of proteins. *Anal Biochem* 357, 128–136.

Sunami, T., Hosoda, K., Suzuki, H., Matsuura, T., et Yomo, T. (2010). Cellular compartment model for exploring the effect of the lipidic membrane on the kinetics of encapsulated biochemical reactions. *Langmuir* 26, 8544–8551.

Sundberg, S.A. (2000). High-throughput et ultra-high-throughput screening: solution- et cell-based approaches. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 47–53.

Svetina, S. (2009). Vesicle budding et the origin of cellular life. *Chemphyschem* 10, 2769–2776.

Swarts, H.G., Van Uem, T.J., Hoving, S., Fransen, J.A., et De Pont, J.J. (1991). Effect of free fatty acids et detergents on H,K-ATPase. The steady-state ATP phosphorylation level et the orientation of the enzyme in membrane preparations. *Biochim Biophys Acta* 1070, 283–292.

Swartz, J. (2006). Developing cell-free biology for industrial applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 476–485.

Szostak, J.W., Bartel, D.P., et Luisi, P.L. (2001). Synthesizing life. *Nature* 409, 387–390.

Takakura, K., et Sugawara, T. (2004). Membrane dynamics of a myelin-like giant multilamellar vesicle applicable to a self-reproducing system. *Langmuir* 20, 3832–3834.

Tam, J., Cordier, G.A., Balint, S., Sandoval Alvarez, A., Borbely, J.S., et Lakadamyali, M. (2014). A microfluidic platform for correlative live-cell et super-resolution microscopy. *PLoS One* 9, e115512.

Tan, C., Saurabh, S., Bruchez, M.P., Schwartz, R., et Leduc, P. (2013). Molecular crowding shapes gene expression in synthetic cellular nanosystems. *Nat. Nanotechnol.* 8, 602–608.

Tanaka, T., et Yamazaki, M. (2004). Membrane fusion of giant unilamellar vesicles of neutral phospholipid membranes induced by La³⁺. *Langmuir* 20, 5160–5164.

Terasawa, H., Nishimura, K., Suzuki, H., Matsuura, T., et Yomo, T. (2012). Coupling of the fusion et budding of giant phospholipid vesicles containing macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U A* 109, 5942–5947.

Tsarmopoulos, I., Gourgues, G., Blanchard, A., Vashee, S., Jores, J., Lartigue, C., et Sirand-Pugnet, P. (2016). In-Yeast Engineering of a Bacterial Genome Using CRISPR/Cas9. *ACS Synth. Biol.* 5, 104–109.

Tully, J.B., JM. Laigret, F. et Whitcomb, R. (1993). Revised Taxonomy of the Class Mollicutes: Proposed Elevation of a Monophyletic Cluster of Arthropod-Associated Mollicutes to Ordinal Rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with Provision for Familial Rank To Separate Species with Nonhelical Morphology (Entomoplasmataceae fam. nov.) from Helical Species (Spiroplasmataceae), et Emended Descriptions of the Order Mycoplasmatales, Family Mycoplasmataceae. *Intern. J. Syst. Bacteriol.*

Van Dongen, S.F.M., Nallani, M., Cornelissen, J.J.L.M., Nolte, R.J.M., et van Hest, J.C.M. (2009). A Three-Enzyme Cascade Reaction through Positional Assembly of Enzymes in a Polymersome Nanoreactor. *Chem. – Eur. J.* 15, 1107–1114.

- Vautrin, C., Zemb, T., Schneider, M., et Tanaka, M. (2004). Balance of pH and Ionic Strength Influences on Chain Melting Transition in Catanionic Vesicles. *J. Phys. Chem. B* *108*, 7986–7991.
- Veis, A. (2011). A review of the early development of the thermodynamics of the complex coacervation phase separation. *Adv. Colloid Interface Sci.* *167*, 2–11.
- Vinarov, D.A., Lytle, B.L., Peterson, F.C., Tyler, E.M., Volkman, B.F., et Markley, J.L. (2004). Cell-free protein production et labeling protocol for NMR-based structural proteomics. *Nat. Methods* *1*, 149–153.
- Vriezema, D.M., Garcia, P.M.L., Sancho Oltra, N., Hatzakis, N.S., Kuiper, S.M., Nolte, R.J.M., Rowan, A.E., et van Hest, J.C.M. (2007). Positional Assembly of Enzymes in Polymersome Nanoreactors for Cascade Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* *46*, 7378–7382.
- Walde, P.G., A. Monnard, PA. Wessicken, M. Luisi, PL. (1994). Oparin's reactions revisited : Enzymic synthesis of Poly(adenylic acid) in micelles et self-reproducing vesicles. *J Am Chem Soc.*
- Walde, P., et Ichikawa, S. (2001). Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity et applications. *Biomol Eng* *18*, 143–177.
- Walde, P., Cosentino, K., Engel, H., et Stano, P. (2010). Giant Vesicles: Preparations and Applications. *ChemBioChem* *11*, 848–865.
- Wang, M., et Wang, Y. (2014). Development of surfactant coacervation in aqueous solution. *Soft Matter* *10*, 7909–7919.
- Wang, B.L., Ghaderi, A., Zhou, H., Agresti, J., Weitz, D.A., Fink, G.R., et Stephanopoulos, G. (2014). Microfluidic high-throughput culturing of single cells for selection based on extracellular metabolite production or consumption. *Nat Biotechnol* *32*, 473–478.
- Whitt, M., Buonocore, L., et Rose, J.K. (2001). Liposome-mediated transfection. *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 10*, Unit 10.16.
- Wick, R., et Luisi, P.L. (1996). Enzyme-containing liposomes can endogenously produce membrane-constituting lipids. *Chem Biol* *3*, 277–285.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* *51*, 221–271.
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., et Hurley, J.H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* *458*, 172–177.
- Xu, R., Fitts, A., Li, X., Fernandes, J., Pochampally, R., Mao, J., et Liu, Y. (2016). Facile quantification of small extracellular vesicles by size exclusion chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chem.*
- Xu, X., Costa, A., et Burgess, D.J. (2012). Protein encapsulation in unilamellar liposomes: high encapsulation efficiency et a novel technique to assess lipid-protein interaction. *Pharm Res* *29*, 1919–1931.
- Xu, Y., Mazzawi, M., Chen, K., Sun, L., et Dubin, P.L. (2011). Protein purification by polyelectrolyte coacervation: influence of protein charge anisotropy on selectivity. *Biomacromolecules* *12*, 1512–1522.

- Yamada, A., Yamanaka, T., Hamada, T., Hase, M., Yoshikawa, K., et Baigl, D. (2006). Spontaneous transfer of phospholipid-coated oil-in-oil et water-in-oil micro-droplets through an oil/water interface. *Langmuir* 22, 9824–9828.
- Yamaji, K., Kanai, T., Nomura, S.M., Akiyoshi, K., Negishi, M., Chen, Y., Atomi, H., Yoshikawa, K., et Imanaka, T. (2009). Protein synthesis in giant liposomes using the in vitro translation system of *Thermococcus kodakaraensis*. *IEEE Trans Nanobioscience* 8, 325–331.
- Yang, Q., Guo, Y., Li, L., et Hui, S.W. (1997). Effects of lipid headgroup and packing stress on poly(ethylene glycol)-induced phospholipid vesicle aggregation and fusion. *Biophys. J.* 73, 277–282.
- Young, A.T.L., Lakey, J.R.T., Murray, A.G., et Moore, R.B. (2002). Gene therapy: a lipofection approach for gene transfer into primary endothelial cells. *Cell Transplant.* 11, 573–582.
- Yu, W., Sato, K., Wakabayashi, M., Nakaishi, T., Ko-Mitamura, E.P., Shima, Y., Urabe, I., et Yomo, T. (2001). Synthesis of functional protein in liposome. *J Biosci Bioeng* 92, 590–593.
- Yuen, G.L., JG. Edelson, EH (1981). Quantification of monocarboxylic acids from a spark discharge synthesis. *J Mol Evol.*
- Zafar, A., Melendez, R., Geib, S.J., et Hamilton, A.D. (2002). Hydrogen bond controlled aggregation of guanidinium-carboxylate derivatives in the solid state. *Tetrahedron* 58, 683–690.
- Zana, R. (2004). Partial phase behavior and micellar properties of tetrabutylammonium salts of fatty acids: unusual solubility in water and formation of unexpectedly small micelles. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 20, 5666–5668.
- Zhu, T.F., et Szostak, J.W. (2009). Coupled growth and division of model protocell membranes. *J Am Chem Soc* 131, 5705–5713.
- Zhu, T.F., Budin, I., et Szostak, J.W. (2013). Preparation of fatty acid or phospholipid vesicles by thin-film rehydration. *Methods Enzym.* 533, 267–274.
- Zhu, Y., Yang, B., Chen, S., et Du, J. Polymer vesicles: Mechanism, preparation, application, et responsive behavior. *Prog. Polym. Sci.*
- Zonneveld, M.I., Brisson, A.R., van Herwijnen, M.J.C., Tan, S., van de Lest, C.H.A., Redegeld, F.A., Garsen, J., Wauben, M.H.M., et Nolte-'t Hoen, E.N.M. (2014). Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures. *J. Extracell. Vesicles* 3.
- Zubay, G. (1973). In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu. Rev. Genet.* 7, 267–287.

Etude des systèmes de transitions dans les processus d'encapsulation de biomolécules : vers un nouveau modèle de cellule minimale.

La compartimentation est un aspect fondamental dans la compréhension de l'apparition de la vie sur terre mais aussi dans l'élaboration de cellules minimales. Les coacervats sont capables de séquestrer des grandes quantités de molécules par diffusion depuis le milieu extérieur mais ne permettent pas d'encapsuler ces molécules à cause de l'absence de barrière physique entre le milieu intérieur et extérieur. Les vésicules quant à elles, ne permettent pas de séquestrer de grandes quantités de molécules à cause de la bicouche membranaire qui empêche la diffusion des molécules depuis le milieu extérieur. Nous avons développé une nouvelle méthode pour encapsuler des biomolécules basées sur une transition de coacervats à vésicules. Notre système basé sur des acides gras saturés à longues chaînes, peut former des coacervats pour séquestrer des biomolécules puis des vésicules en diminuant le pH pour encapsuler les molécules préalablement séquestrées. Les résultats montrent des taux d'encapsulation supérieurs à ceux obtenus par les méthodes d'encapsulation basées sur l'hydratation de films lipidiques.

L'encapsulation d'enzymes ainsi que des substrats de la réaction dans les vésicules ont permis de montrer l'accomplissement de réactions enzymatiques dans ces compartiments de manière beaucoup plus rapide qu'en milieu dilué permettant de générer un bioréacteur efficace. La synthèse de protéines ainsi que l'accomplissement de voies métaboliques n'ont pas été clairement mise en évidence dans les vésicules et constituent un élément décisif dans l'élaboration d'un nouveau modèle de cellule minimale.

Mots-clés : Compartiments, acides gras, biologie de synthèse, cellule minimale, réaction enzymatique, métabolisme, *Spiroplasma citri*

Study of transition system in biomolecules encapsulation processes: Toward a new model of minimal cell

Compartmentalization is of importance for our understanding of the emergence of life on earth but also for the development and design of minimal cells. Coacervation phenomenon allows spontaneous sequestration by molecular diffusion from aqueous medium but do not allow encapsulation of molecule inside. On the contrary, vesicular systems do not allow spontaneous encapsulation of molecules inside. Here we introduce a model built from saturated long chain fatty acids. This system can form both membranous vesicles and membrane free coacervated droplets that result from clouding by decreasing pH. We have shown that a large amount of proteins is encapsulated into vesicles after pre-crowding into coacervated. Encapsulation of enzyme in vesicles allow to increase the reaction rate compared to the reaction rate in diluted medium. Synthesis of proteins by cell-free system and metabolic reactions with proteins of mollicutes have not clearly been shown but they represent an essential element in the development of a minimal cell.

Keywords: Compartment, fatty acids, synthetic biology, minimal cell, enzymatic reactions, metabolism, *Spiroplasma citri*