



**HAL**  
open science

# **Nanopatterning de surface par un auto-assemblage protéique en nid d'abeille : un nouveau biomatériau pour la nanotechnologie**

Elise Jacquier

## ► To cite this version:

Elise Jacquier. Nanopatterning de surface par un auto-assemblage protéique en nid d'abeille : un nouveau biomatériau pour la nanotechnologie. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. <NNT : 2022GRALV013>. <tel-04950610>

**HAL Id: tel-04950610**

**<https://theses.hal.science/tel-04950610v1>**

Submitted on 17 Feb 2025

**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.



HAL Authorization

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Chimie Biologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Elise JACQUIER**

Thèse dirigée par **Renaud DUMAS**, Directeur de Recherche CNRS, Université Grenoble Alpes et co-encadrée par **Pierre-Henri ELCHINGER**, Maître de conférence, Université Grenoble Alpes

préparée au sein du **Laboratoire Systèmes Moléculaires et Nano Matériaux pour l'Énergie et la Santé** ainsi que du **Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale**

dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

## Nanopatterning de surface par un auto-assemblage protéique en nid d'abeille : un nouveau biomatériau pour la nanotechnologie

## Surface nanopatterning by a honeycomb protein self-assembly: a new biomaterial for nanotechnology

Thèse soutenue publiquement le **15 février 2022**,  
devant le jury composé de :

**Monsieur Franz BRUCKERT**

Professeur des Universités, Grenoble INP, Président du jury

**Madame Emmanuelle LAURENCEAU**

Maître de conférence, Ecole Centrale de Lyon, Rapporteur

**Monsieur Juan ELEZGARAY**

Directeur de Recherche CNRS, Université de Bordeaux, Rapporteur

**Madame Sabine SZUNERITS**

Professeure des Universités, Université de Lille, Examinatrice

**Madame Marta DE FRUTOS**

Chargée de Recherche CNRS, Université de Paris Sud, Examinatrice

**Monsieur Renaud DUMAS**

Directeur de Recherche CNRS, Université Grenoble Alpes, Directeur de thèse

**Monsieur Pierre-Henri ELCHINGER**

Maître de conférence, Université Grenoble Alpes, Invité, Co-encadrant de thèse







# Remerciements

En février 2018 je mettais mon premier pied au CEA. 4 ans plus tard, j'en ressors avec des étoiles pleins les yeux, des souvenirs pleins la tête et un doctorat dans les bras.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse en commençant par Mme Emmanuelle Laurenceau et Mr Juan Elezgaray, qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse, ainsi que Mr Franz Bruckert, Mme Sabine Szunerits et Mme Marta De Frutos pour l'avoir examiné. J'ai beaucoup apprécié les échanges lors de ma soutenance soulevant des questions intéressantes et de nouvelles pistes pour la continuité de ces travaux.

Je tiens à remercier Mr Frédéric Chandezon et Mme Pascale Delangle, respectivement directeur au début de ma thèse et directrice à la fin de ma thèse, du SyMMES. Merci pour votre bienveillance à tous les deux lorsqu'on se croisait au C5 ou au conseil d'unité. Je veux aussi remercier Mr Arnaud Buhot et Mme Yanxia Hou-Broutin, respectivement chef de l'équipe CREAB au début et à la fin de ma thèse. Enfin, du côté de LPCV, je tiens à remercier Mr Eric Maréchal, directeur de l'unité, et Mr François Parcy, chef de l'équipe Flo\_Re.

Merci à Guy Royal et aux membres du conseil de l'EDCSV pour leur accueil pendant les réunions de l'ED. Ceci n'aurait pas été possible sans Marie, Clarisse, Ghadir, Simon, Richard, Damien, Baptiste, Pierre et Simon avec qui j'aurai bien rigoler !

Je voudrai exprimer mon éternelle gratitude à mes deux chefs (vous n'y couperez pas !), Renaud Dumas et Pierre-Henri Elchinger. Merci de m'avoir prise sous vos ailes quand je n'étais alors qu'en M2. Merci d'avoir remuer ciel et terre pour pouvoir me garder en thèse. Merci pour votre bienveillance et votre enthousiasme. Vous êtes de merveilleuses personnes, pas seulement au niveau scientifique. Je repense en souriant à toutes les fois où on discutait d'autre chose que de science et je ne peux pas lister tous les sujets sur lesquels on a discuté ! Je voudrai aussi vous remercier de m'avoir supportée (dans tous les sens du terme) pendant ces 4 ans. Merci d'avoir été aussi compréhensifs quand ça n'allait pas. Merci d'avoir fait avec ma maladresse verbale qui pouvait souvent être mal interprétée. Merci d'avoir cru en moi et en mon travail quand moi-même je n'y arrivais plus.

Je tiens à remercier l'équipe CREAB pour votre gentillesse et tous les bons moments passés avec vous. Je tiens à remercier plus particulièrement, Elodie pour m'avoir fait confiance et m'avoir fait mettre un pied dans le monde de l'enseignement. Ta bienveillance, ton enthousiasme et ton dynamisme m'ont toujours impressionnée ! Raph pour tes conseils musicaux toujours intéressants. Arnaud, Didier et Yoann pour votre bienveillance et vos conseils. Aux anciens et aux nouveaux. A Annette, Abdu et Lucie les cobureaux du fond du couloir pendant le stage. A Eric, Charlotte, Oleksii les cobureaux de choc de la thèse. Thanks to you Jon, for your smile and your enthusiasm! Mille merci à vous tous pour les pause-café, les sorties au bar, les sessions squashes, les randos... A toi Christine, pour les cafés à BioMade et pour tout le reste.

A ma deuxième équipe Flo\_Re, j'aimerais vous dire que je vous suis reconnaissante pour tout. Merci de m'avoir si bien intégrée dans l'équipe. A François pour ta bienveillance. A Gaby pour ta gentillesse et toutes nos discussions accompagnées ou non de café ! A Manu pour tes

boutades, pour t'être toujours rendu disponible pour moi et m'avoir fait autant rire au labo ! Je voudrai aussi que tu saches que ce n'est en aucun cas la taille qui compte et que c'est dans le silence que les mots prennent tout leur sens. A Philippe compagnon de labo quand le soleil est à peine lever et maintenant dinosaure des non permanents de l'équipe ! Nos discussions me manqueront c'est sûr... A Cora pour les conseils jeux vidéo (Hadès à jamais dans mon cœur) et les conversations quand on arrivait à coordonner nos emplois du temps. Je suis triste de savoir que je ne t'entendrai plus chanter dans le labo... A la team infogérance, Romain, Laura et Jérémy. J'étais à deux doigts de l'écrire pas correctement juste pour t'embêter ! Ça va me manquer de ne plus te rappeler que t'es vieux et que ton « travail » consiste à appuyer sur la barre d'espace et attendre ;-). A toi Anto, mon co-thésard pour m'avoir épaulé quand j'étais au fond, pour les bons délires au labo et en dehors et bien sûr les memes ! A Elodie P. qui est partie au milieu du voyage mais à qui je pense souvent. Je n'oublie pas les sessions pétanques chez Renaud, les sessions bars et les randos partagées tout au long du chemin.

Etant dans deux laboratoires différents dans deux bâtiments différents, j'ai eu l'occasion de rencontrer beaucoup de belles personnes. A toi Caroline qui était aussi tiraillée entre le C5 et le C2 mais pour des batteries. Manon, j'aimerais te dire que tu es une personne forte, incroyable et une photographe talentueuse. Peu importe où la vie nous mènera, je sais que tu seras toujours avec moi. Camille, je suis très heureuse de t'avoir rencontrée. Je ne doute pas une seule seconde que tu seras une scientifique extraordinaire en plus d'être déjà une personne formidable ! A Louise petite boule d'amour, merci pour tout. Tu m'auras autant fait rire qu'émue. Tu as un talent indéniable, ne l'oublie jamais. A vous Sophie et Tiffany, la team admin de choc pour votre gentillesse. A Sylvie, reine incontestable de la réparation. A Marie, Steph, Seb, Nolwenn, Damien, Fabien, Elodie A., Yorgos, Etienne et à toute la team Total, mille merci pour tous ces bons moments, à vos côtés j'aurai bien rigolé ! C'est bon Vangeli, tu peux t'arrêter de lire ma thèse maintenant que j'ai cité ton nom :-P.

Je tiens aussi à remercier ma team « microscopies ». Merci à Benjamin Grevin pour être venu discuter avec moi pendant les longues heures d'acquisition à l'AFM du C5. A Denis Mariolle pour tous tes précieux conseils sur l'AFM. A Pierre-Henri Jouneau, je voudrais te dire que j'ai beaucoup aimé travailler avec toi, quand j'arrivais à t'attraper à la PFNC évidemment. Merci de m'avoir formée à la microscopie, d'avoir toujours été partant pour les manips un peu farfelues ! A toi Denis Falconet pour avoir été mon tuteur pendant les CSI, pour les discussions autour de la microscopie et des dizaines de projets que tu as encore alors que la retraite est là et aussi pour le fameux « safran » utilisé pour colorer les grilles. Ton enthousiasme après autant d'années de recherche me laisse rêveuse. J'espère que je serai comme toi plus tard ! J'en profite pour remercier Pascal Mailley et Jean-Luc Putaux pour tous vos conseils lors de mes CSI.

Je me dois de remercier du mieux que je peux, même si mes mots ne seront jamais à la hauteur de la gratitude que je vous porte, deux personnes très spéciales rencontrées dans cette aventure. Greg, je t'avoue que je ne sais pas par quel bout te prendre (j'étais obligée !). Mille merci d'avoir été patient et d'avoir su lire entre mes lignes. A toutes les petites personnes qui habitent nos têtes, aux blagues douteuses tout au long de la journée mais surtout très matinales, à nos discussions sur la vie, sur le Process Com, sur les séries, les bouquins, les jeux vidéo... Tu as été un précieux pilier dans cette aventure avec des conseils qui valaient de l'or.

Merci (et désolée) d'avoir partagé mes joies et mes peines. Tu vois, c'est pas si difficile d'écrire un petit mot !

A toi Marie, la nouvelle thésarde tombée de vélo qui est devenue une amie si précieuse à mes yeux. Je ne saurais par où commencer. Merci de m'avoir remise le nez dans la course et le yoga. Merci pour toutes ces soirées à squatter chez toi à discuter pendant des heures alors qu'on avait pas arrêté de la journée ! Aux sessions montagnes, courses, shopping, Monopoly pendant le confinement... Quelle chance j'ai eu (et j'ai toujours !) de t'avoir à mes côtés... Parce que l'aventure n'aurait pas été la même sans toi. Parce qu'on s'est serrées les coudes du début à la fin. Merci d'être là. Merci de comprendre si bien ce qu'il y a dans ma tête. Merci, merci, merci...

Tout cela n'aurait pas été possible sans le soutien de mes amis de longues dates. A Laetitia, Lulu et Adeline qui ne sont jamais bien loin et que j'arrive toujours à retrouver à un moment donné. A toi Adèle qui est toujours au taquet pour tout. Merci pour les coups de fil, les invitations pour que je te batte au 7Wonders Duels, les discussions sur à peu près tout et n'importe quoi. Merci de m'avoir remonté le moral quand c'était plus que nécessaire... A Justine, toi qui fût ma première copine de fac, rapprochées par les géosciences et renforcées par le temps. Aux fous rires qui ont égayé ma vie lyonnaise et ceux qu'on a eu en lisant certains remerciements de thèse. A ton « Quand tu écriras ta thèse, je veux un remerciement hein ! » étant persuadée que je me lancerai dans cette aventure alors que je me demandais ce que j'allais bien pouvoir faire de ma vie ! Je peux t'assurer que quand j'ai écrit cette partie, j'avais envie d'écrire un roman sur chaque personne et de remercier la terre entière et les gâteaux... Merci de toujours être là après tout ce temps. A Sarah qui est à jamais dans mon cœur. A Stéphane à qui je pense souvent. A Clémence que j'admire pour sa force de caractère dans l'épreuve que tu traverses. A Marina pour ces chouettes sessions vacances. A Lois, Hugo, Grégoire, Léa, Marine et Laurane que je vois trop peu à mon goût mais qui sont toujours là...

Je remercie ma grand-mère, mes parents, mes sœurs et mes beaux-frères pour avoir pris autant soin de moi tout au long de ces années (et je ne parle pas que de ces années de thèse !). Vous croyez en moi bien plus que moi je n'en suis capable. Merci de composer si bien avec mon caractère souvent « perché », d'avoir été (et de toujours être !) aussi compréhensifs, d'être là peu importe ce qu'il se passe et de m'avoir toujours encouragée... Je vous aime de tout mon cœur...

Je dédie ce manuscrit à mes nièces Lucie, Axelle et Clémence. Si un jour vous lisez ces mots sachez que votre rencontre m'a changée et je ne souhaite qu'une chose, continuer de vous voir grandir au fil des années. J'espère que vous trouverez votre place dans ce monde et que vous pourrez sentir votre cœur vibrer comme le mien le fait lorsque j'écris ces mots. Peu importe où la vie me mènera, je serai toujours là pour vous, c'est une promesse.

Je terminerai en vous disant que j'embarque avec moi une partie de chacun d'entre vous et j'espère vraiment que nos chemins se recroiseront...

*« Trébucher soulève les réponses sur l'chemin que l'on prend »*

Eta – Deux vies



## Table des matières

<i>Liste des abréviations.....</i>	<i>10</i>
<i>Introduction générale.....</i>	<i>13</i>
<i>Chapitre 1 : Auto-assemblage de briques de base : construction de nanostructures pour des applications dans l'électronique, l'énergie et les biocapteurs.....</i>	<i>16</i>
1.1 L'auto-assemblage comme outil de création de structure supramoléculaire.....	17
1.1.1 Les mécanismes d'auto-assemblage à l'échelle nanométrique.....	17
1.1.2 Paramètres influençant l'auto-assemblage .....	18
1.2 Quelques exemples de briques de base et les applications associées dans le cadre du nanopatterning de surface .....	19
1.2.1 Présentation de la revue .....	20
1.2.2 Revue.....	21
1.3 Caractérisation des auto-assemblages.....	64
1.3.1 La microscopie électronique .....	64
1.3.2 La microscopie à force atomique .....	67
1.4 Conclusion.....	68
1.5 Projet de thèse.....	70
<i>Chapitre 2 : Ancrage, croissance et fonctionnalisation du nid d'abeille GbLFY-SAM sur surface.....</i>	<i>74</i>
2.1 Présentation de l'article.....	75
2.1.1 Contexte par rapport aux travaux de thèse.....	75
2.1.2 Article.....	76
2.2 Résultats complémentaires.....	97
2.2.1 Croissance contrainte des auto-assemblages .....	97
2.2.2 Auto-assemblages et film protéique organisé.....	98
2.2.3 Extension du marquage des pores à d'autres métaux divalents.....	101
2.3 Conclusion et perspectives du chapitre.....	103
<i>Chapitre 3 : Une nanostructure en nid d'abeille adaptable grâce à la modulation de la partie C- terminale.....</i>	<i>106</i>
3.1 Caractéristiques des mutants de la partie C- terminale .....	107
3.1.1 Stratégies de design des mutants.....	107
3.1.2 Structures tertiaires des mutants par modélisation .....	108
3.1.3 Production et purification des mutants .....	111
3.1.4 Auto-assemblage des mutants.....	111
3.2 Stratégies de métallation des nids d'abeille pour la création de nanopiliers d'or..	117
3.2.1 Par l'utilisation d'ions Au <sup>3+</sup> .....	117
3.2.2 Par le greffage de nanoparticules d'or.....	119
3.3 Autre stratégie de fonctionnalisation : les acides aminés non canoniques.....	121
3.3.1 Principe des acides aminés non canoniques.....	121
3.3.2 Choix de l'acide aminé non canonique : la 4-azido-L-phénylalanine .....	122
3.3.3 Incorporation de AzF dans GbLFY-SAM .....	123

3.4	Conclusion et perspectives du chapitre.....	129
<b>Chapitre 4 : Utilisation des nids d'abeille GbLFY-SAM pour des applications en biocapteurs .....</b>		
<b>131</b>		
4.1	Activité de type peroxydase des nanoparticules : biocapteurs pour la détection de glucose.....	132
4.1.1	Intérêt des nanoparticules métalliques dans les biocapteurs à glucose.....	132
4.1.2	Réaction TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> catalysée par des nanoparticules métalliques.....	133
4.1.3	Evaluation de l'activité peroxydase de l'auto-assemblage GbLFY-SAM fonctionnalisé avec des CuNp.....	134
4.1.4	Conclusion.....	138
4.2	Détection de composés organiques volatiles par résonance des plasmons de surface	139
4.2.1	Principe de la résonance des plasmons de surface.....	139
4.2.2	Détection de composés organiques volatiles.....	140
4.2.3	Intérêt de l'utilisation des auto-assemblages GbLFY-SAM .....	141
4.2.4	Détection de COV par SPR grâce à l'auto-assemblage de GbLFY-SAM .....	142
4.2.5	Conclusion.....	146
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>		<b>149</b>
<b>Matériels et méthodes.....</b>		<b>156</b>
6.1	Production et purification des protéines.....	156
6.1.1	Plasmides utilisés.....	156
6.1.2	Préparation des plasmides.....	156
6.1.3	Production des protéines .....	156
6.1.4	Purification des protéines.....	157
6.1.5	Remplacement du tampon de purification.....	160
6.2	Caractérisation du nid d'abeille formé par GbLFY-SAM.....	160
6.2.1	Auto-assemblage sur surface.....	160
6.2.2	Visualisation en microscopie électronique et analyse des images.....	161
6.2.3	Mesure de la hauteur par AFM et analyse des scans .....	162
6.3	Fonctionnalisation des auto-assemblages.....	162
6.3.1	Sels de métaux et réduction.....	162
6.3.2	Fonctionnalisation avec les nanoparticules d'or.....	162
6.3.3	Analyse EDX des auto-assemblages fonctionnalisés .....	162
6.4	Réaction entre le TMB et l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> médiée par les CuNp dans les auto-assemblages GbLFY-SAM .....	163
6.5	Détection du phénol par SPRi.....	163
6.5.1	Spotting des auto-assemblages sur un prisme en verre.....	163
6.5.2	Mesures SPRi .....	164
<b>Annexes.....</b>		<b>166</b>
<b>Références.....</b>		<b>169</b>

## Liste des abréviations

aa <sub>nc</sub>	Acide aminé non canonique
aaRS	Aminoacyl-ARNt synthétase
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
AzF	4-azido-L-Phénylalanine, Phénylalanine azoturée
BCP	<i>Block copolymers</i> , copolymers à blocs
ca.	<i>Circa</i> , autour de
CAPS	acide N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonique
CNC	<i>Cellulose nanocrystal</i> , nanocristaux de cellulose
CNF	<i>Cellulose nanofiber</i> , nanofibres de cellulose
COV	Composé organique volatile
CuNp	Nanoparticules de cuivre
DSSC	<i>Dye-sensitized solar cell</i> , cellule solaire à pigment photosensible
DTT	
EDX	<i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> , spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie
FF	Diphenylalanine
FFT	<i>Fast Fourier transform</i> , transformée de Fourier rapide
FIB	<i>Focused ion beam</i> , sonde ionique focalisée
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i> , transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
Gb	<i>Ginkgo biloba</i>
GbLFY-SAM	Domaine d'oligomérisation SAM de la protéine LEAFY issue du <i>Ginkgo biloba</i>
GOx	Glucose oxydase
HEPES	Acide 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1yl]ethanesulfonique
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , peroxydase de raifort
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LFY	Protéine LEAFY
LIB	<i>Lithium ion battery</i> , batterie lithium-ion
LSPR	<i>Localized surface plasmon</i> , résonance des plasmons de surface localisée
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> , électrophorèse en gel de polyacrylamide
PCE	<i>Power conversion efficiency</i> , efficacité énergétique
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , réaction de polymérisation en chaîne
PDB	<i>Protein data bank</i>
SAM	<i>Sterile alpha motif</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SEC	<i>Steric exclusion chromatography</i> , chromatographie d'exclusion stérique
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> , microscopie électronique à balayage
SERS	<i>Surface-enhanced Raman spectroscopy</i> , effet Raman exaltée de surface
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> , résonance des plasmons de surface
STEM	<i>Scanning transmission electron microscopy</i> , microscopie à balayage et en transmission
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> , microscopie à transmission
TEV	<i>Tobacco etch virus</i> , virus de la gravure du tabac

TMB	3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i> , virus de la mosaïque du tabac
Tris	2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol



## Introduction générale

Les nanosciences constituent un domaine scientifique transverse et multidisciplinaire dont les objets d'étude ont des dimensions classiquement inférieures à 100 nanomètres. Depuis une quinzaine d'années, et grâce au développement d'outils de caractérisation et d'analyse de plus en plus performants, ce domaine connaît un essor considérable. Adossée aux nanosciences, la nanotechnologie tire parti des avancées et découvertes mises en lumière lors de l'étude de ces « nano-objets » en vue d'applications. En réalité, pour de si petites tailles, il y a de nouveaux phénomènes physiques qui apparaissent soit au sein des objets nanométriques ou entre ces objets leur conférant des propriétés mécaniques, optiques ou encore électroniques particulièrement intéressantes.

La nanotechnologie trouve des applications dans des domaines divers comme la microélectronique, le biomédical, la biotechnologie ou encore l'énergie. Pour ces applications, les dispositifs présentent un support de qui est une surface pouvant transmettre un signal électrique. Ces surfaces sont aussi nanostructurées c'est-à-dire qu'une topographie va être créée sur celles-ci. Comparée à des surfaces planes, cette topographie permet d'accroître la sensibilité des dispositifs par l'augmentation de la surface spécifique. Cette nanostructuration de surface est aussi appelée « nanopatterning de surface ». D'une manière plus générale, le nanopatterning de surface permet de contrôler finement la topographie de la surface en créant des motifs de taille nanométrique pouvant s'étendre sur une échelle allant du micromètre au centimètre.

Au fil des années, deux grandes approches se sont distinguées pour structurer à un niveau nanométrique des surfaces. D'une part, il y a les techniques dites *top-down* (« du haut vers le bas ») qui permettent d'obtenir, à partir d'un bloc macroscopique, un réseau de motifs nanométriques comme un tailleur de pierre aboutirait à une sculpture à partir d'un cube de calcaire. D'autre part, il y a les techniques dites *bottom-up* (« du bas vers le haut ») qui reposent sur l'utilisation de propriétés d'auto-assemblage de molécules pour créer un réseau de motifs comme lorsque l'on associe des briques de Lego® entre-elles.

L'auto-assemblage est une organisation spontanée de composés (appelés par la suite « briques de base ») régit par des principes physico-chimiques d'attraction ou de répulsion aboutissant à la formation de structure supramoléculaire ayant un haut degré d'organisation. Ces structures supramoléculaires sont des éléments clés pour de nombreuses fonctions biologiques dans les organismes vivants et sont, depuis des années, étudiées fondamentalement. Par la suite, ces structures naturellement construites ont inspiré de nombreuses approches biomimétiques dans le but de créer des nanostructures utiles pour des applications dans la nanotechnologie.

Le détournement de nanostructures biologiques à des fins applicatives en nanotechnologie est un axe de recherche qui est développé depuis quelques années au sein de l'équipe Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude d'Assemblages Biologiques (CREAB) de l'unité mixte de recherche Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé (SyMMES). Au départ spécialisé dans les nanostructures basées sur l'ADN, le CREAB s'est récemment tourné vers les nanostructures protéiques grâce à une collaboration étroite avec l'équipe des régulateurs du développement de la fleur (Flo\_RE) de l'unité mixte de recherche Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale (LPCV). Ces travaux de thèse ont émergé de cette collaboration et ils visent à étudier l'auto-assemblage sur surface du domaine d'oligomérisation d'un régulateur floral, la protéine LEAFY, pour en faire un biomatériau utilisable pour des applications en nanotechnologie.

Ce manuscrit est composé d'un premier chapitre qui, après un bref rappel sur l'auto-assemblage et les mécanismes physiques associés, dressera l'état de l'art de différentes briques

de base utilisées pour créer des nanostructures auto-assemblées dans le cadre du nanopatterning de surface. L'utilisation de ces auto-assemblages mésoporeux pour des applications dans le domaine de l'électronique, de l'énergie mais aussi des biocapteurs sera aussi décrite. Les briques de bases ainsi que leurs applications seront présentées sous la forme d'une revue de littérature actuellement soumise. La fin de ce chapitre décrira les outils de caractérisation utilisés tout au long de mes travaux de thèse et nécessaires pour l'étude de nanostructures.

Le deuxième chapitre du manuscrit présentera plus précisément la croissance, l'ancrage et la caractérisation de l'auto-assemblage protéique ayant une forme de nid d'abeille ainsi que sa fonctionnalisation par les ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Au}^{3+}$ . Cette présentation s'appuiera sur un article scientifique qui a été publié et dans lequel ces deux points sont largement décrits. En plus des expériences publiées, d'autres expériences ont été réalisées pour essayer de comprendre plus finement la croissance de l'auto-assemblage sur la surface ainsi que sa fonctionnalisation par des ions métalliques.

Le troisième chapitre sera consacré à la modulation de la partie C- terminale de la protéine. L'objectif ici est de montrer que l'auto-assemblage protéique étudié est versatile et qu'il est possible de modifier sa fonctionnalisation soit en utilisant des ions métalliques soit en greffant de manière covalente des nanoparticules dans l'auto-assemblage.

Les premiers résultats obtenus pour l'utilisation de l'auto-assemblage dans le cadre d'applications de type biocapteurs seront exposés dans le quatrième et dernier chapitre de ce manuscrit. Plus précisément, la première partie de ce chapitre sera consacrée à l'évaluation de l'auto-assemblage dans le cadre d'un biocapteur à glucose tandis que la seconde partie sera consacrée à son utilisation dans le cadre de la détection de composés organiques volatiles.

Enfin, les conclusions et perspectives ouvriront sur des axes de développement ainsi que sur d'autres applications que peuvent avoir ces travaux dans le futur.



# Chapitre 1 : Auto-assemblage de briques de base : construction de nanostructures pour des applications dans l'électronique, l'énergie et les biocapteurs

Dans ce premier chapitre, dédié à l'étude bibliographique du contexte entourant mon sujet de thèse, une première partie présentera quelques notions fondamentales relatives aux mécanismes d'auto-assemblages. Puis il se poursuivra sous forme d'une revue soumise. L'accent sera mis sur différentes briques de base capables de créer des auto-assemblages ainsi que leurs utilisations. Plus précisément, les auto-assemblages basés sur des polymères chimiques (copolymères à bloc) et biologiques (cellulose et chitine) mais aussi sur de l'ADN, des peptides et des protéines seront détaillés. Enfin, la deuxième partie de cette revue sera consacrée à la mise en perspective de ces auto-assemblages dans le contexte d'applications nanotechnologiques que sont l'électronique, l'énergie et les biocapteurs. La dernière partie de ce chapitre bibliographique sera consacrée à la présentation des outils de caractérisation utilisés tout au long de ma thèse : les techniques de microscopie électronique et de microscopie à force atomique. Enfin, les objectifs de mon travail de thèse seront détaillés.

## 1.1 L'auto-assemblage comme outil de création de structure supramoléculaire

L'utilisation de l'auto-assemblage afin de créer des structures supramoléculaires n'est pas un processus nouveau : la Nature en est la première utilisatrice. Elle est capable, à partir de briques de bases simples comme les acides aminés, les acides nucléiques, les lipides ou encore les sucres, de construire des architectures aussi sophistiquées que des cellules. Dans un premier temps, ces auto-assemblages naturels ont été étudiés de manière fondamentale afin de comprendre leurs mécanismes d'association révélant ainsi leurs fonctions *in vivo*. Par la suite, de nombreux travaux se sont inspirés de ces mécanismes d'auto-assemblage pour les imiter ou les détourner de leurs fonctions premières.

### 1.1.1 Les mécanismes d'auto-assemblage à l'échelle nanométrique

D'une manière générale, les mécanismes d'auto-assemblage mettent en jeu, dans un système donné, une organisation spontanée d'entités appelées briques de base capables d'interagir entre elles. L'auto-assemblage permet de faire passer ces briques de base, aléatoirement distribuées, d'un état désordonné à un état ordonné et structuré sans intervention extérieure au système. Tout comme le processus d'agrégation, l'auto-assemblage est une recherche globale d'une énergie libre plus basse que lorsque les briques de base ne sont pas assemblées. Lors du processus d'auto-assemblage, les briques de bases vont interagir de manière à former des motifs supramoléculaires réguliers définis par leurs propriétés intrinsèques. Les interactions entre les briques de base sont surtout médiées par des liaisons faibles comme les liaisons hydrogènes, les interactions électrostatiques ou encore les liaisons de van der Waals<sup>1</sup>. Ces liaisons non covalentes sont définies par :

- 1) Leur énergie,
- 2) Leur portée, c'est-à-dire la distance à laquelle doivent se situer les atomes pour que l'interaction puisse se faire,
- 3) Leur caractère directionnel ou non qui traduit si l'association des atomes présente une orientation préférentielle ou non.

Il est important de noter ici que ces liaisons non covalentes présentent des énergies largement inférieures à celle de la liaison covalente (entre 100 et 500 kcal.mol<sup>-1</sup>) ce qui rend l'auto-assemblage à la fois fragile et versatile (Tableau 1.1).

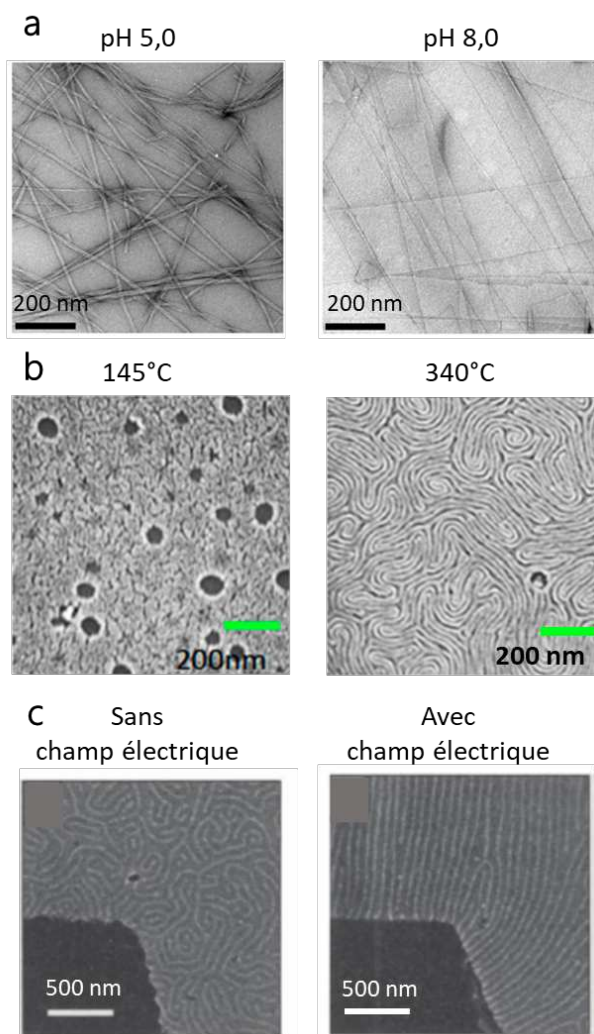
A l'échelle nanométrique, le mécanisme d'auto-assemblage peut se distinguer en auto-assemblage intramoléculaire et en auto-assemblage intermoléculaire. L'auto-assemblage intramoléculaire fait référence à la capacité qu'ont certaines molécules à adopter une structure spéciale dans l'espace aboutissant à des propriétés spécifiques. L'auto-assemblage intermoléculaire, quant à lui, fait référence aux propriétés de reconnaissance entre plusieurs molécules aboutissant aux structures supramoléculaires. Un exemple de structure qui allie à la fois l'auto-assemblage intra et intermoléculaire est la capsid virale. Il y a un d'un côté l'auto-assemblage intramoléculaire des acides aminés de la protéine virale et de l'autre côté, l'auto-assemblage intermoléculaire de plusieurs protéines virales entre elles aboutissant à la formation de la capsid.

Nature de l'interaction	Energie associée (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Portée de l'interaction (Å)	Caractère
Electrostatique, ionique	de 1,2 à 57,7	de 1 à 100	Non directionnel
Liaison H	de 1,2 à 16,1	de 1,5 à 3,5	Directionnel
Interaction $\pi$ - $\pi$	de 0,5 à 23,0	< 5	Directionnel
Liaison de Van der Waals	de 0,5 à 2,0	< 10	Non directionnel

**Tableau 1.1:** Caractéristiques principales de quelques modes d'interaction participant à l'auto-assemblage d'une structure supramoléculaire. D'après la référence<sup>2</sup>.

### 1.1.2 Paramètres influençant l'auto-assemblage

Par définition l'auto-assemblage ne nécessite aucun apport externe pour fonctionner mais il est important de noter que ce phénomène peut être modulé. Cette modulation est possible en influant sur les probabilités et/ou la nature des interactions des briques de bases en changeant l'environnement dans lequel elles se trouvent. Il est possible d'exercer une influence sur les propriétés électrostatiques des briques de base. Par exemple, la modification du pH va entraîner un changement de protonation des groupes basiques ou acides des molécules d'intérêt pouvant ainsi affecter la formation des liaisons hydrogènes et des interactions ioniques. Wakabayashi et al.<sup>3</sup> ont démontré, pour un peptide aromatique amphiphile (Fmoc-L<sub>n</sub>QG) qu'il était capable, à pH 5,0, de former des structures fibreuses et une structure plus large dite en ruban lorsque le pH atteint 8,0 (Figure 1.1.a). Sur le même principe, la température et le temps d'auto-assemblage peuvent influencer la structure obtenue. Ces paramètres ont de l'influence sur le mouvement Brownien des molécules d'intérêt. Dans leurs travaux, Jiang et al.<sup>4</sup> ont montré qu'à une température de 145°C, le copolymère à bloc polystyrène-b-poly(dimethylsiloxane) n'adopte pas de structure préférentielle tandis que lorsque la température atteint 340°C, il adopte une structure en empreinte (Figure 1.1.b). Par ailleurs, selon le type de briques de base utilisées, elles peuvent présenter une asymétrie au niveau de leur charge et donc être considérées comme des dipôles électrostatiques. Ainsi, en utilisant soit un champ magnétique soit un champ électrique l'orientation des briques de base sera modifiée. En utilisant cette stratégie, Morkved et al.<sup>5</sup> ont montré que le copolymère à bloc polystyrène-b-poly(methyl methacrylate) passait d'une structure en empreinte à une structure droite grâce à l'application d'un champ électrique (Figure 1.1.c). Le fait de moduler l'auto-assemblage de ces molécules va, d'une manière générale, aboutir à un changement de morphologie dans la structure supramoléculaire.



**Figure 1.1** : Exemple de modulation du processus d'auto-assemblage grâce au pH (a), à une variation de température (b) et à un champ électrique (c). Images en microscopie électronique tirées respectivement des références<sup>3,4,5</sup>.

## 1.2 Quelques exemples de briques de base et les applications associées dans le cadre du nanopatterning de surface

Lorsque les briques de base sont auto-assemblées, il y a la formation de matériaux mésoporeux présentant des motifs souvent réguliers et bien définis. La nomenclature des structures ainsi formées est diverse et souvent reliée à la morphologie obtenue. Cependant, elles sont classées en quatre catégories qui sont fonction de la place dans l'espace occupé par les structures. Par exemple, les nanosphères seront catégorisées en « 0 dimension », les nanotubes et nanofibrilles en « 1 dimension », les *nanosheets* en « 2 dimensions » (2D) et enfin, les structures multicouches en « 3 dimensions » (3D)<sup>6</sup>. Les deux dernières (*nanosheets* et multicouches) sont particulièrement intéressantes dans le cadre du nanopatterning de surface. Cette technique ayant pour but de créer une topographie sur la surface, elle est largement utilisée dans le domaine des nanotechnologies<sup>7-10</sup>. L'utilisation de nanostructures en 2D ou en 3D dans ce contexte permet à la fois de couvrir de large portion de la surface à structurer mais aussi d'obtenir des réseaux de motifs de taille nanométrique. De plus, ces réseaux mésoporeux présentent l'avantage de pouvoir

être greffés spécifiquement au niveau de leurs pores. Cette caractéristique permet d'étendre leur potentiel d'applications aux catalyseurs par exemple.

### 1.2.1 Présentation de la revue

Les recherches menées lors de la fabrication de dispositifs nanotechnologiques ont démontré que la création d'une topographie de surface permet une augmentation de la performance des dispositifs. Ce phénomène est valable aussi bien pour des dispositifs de diagnostic<sup>11</sup> que pour des dispositifs électroniques<sup>12</sup> ou encore pour des dispositifs liés à l'énergie<sup>13</sup>. Sur la surface, plus les motifs sont resserrés, c'est-à-dire que la distance centre-centre entre deux motifs adjacents est petite (en anglais, le terme *pitch* est utilisé) ; meilleure sera la performance du dispositif. Cependant, les techniques dites *top-down* couramment utilisées pour créer cette topographie de surface, arrivent à une limite physique de l'ordre de 20 nm et ce malgré les efforts fournis pour les améliorer.

Tout cela a participé à l'augmentation de l'intérêt pour le nanopatterning de surface par des auto-assemblages au cours de ces dernières années. En effet, ces matériaux présentent plusieurs avantages :

- 1) Un pitch en dessous de la limite des techniques *top-down* (sous les 20 nm),
- 2) Un contrôle quasi atomique de la nanostructure,
- 3) Un bas coût par rapport aux techniques *top-down*.

De très nombreuses briques de base ont été développées, étudiées et utilisées pour créer des auto-assemblages adaptés afin de répondre au besoin de cette quête de miniaturisation.

Dans cette revue, nous avons tout d'abord décrit différentes briques de base régulièrement décrites dans la littérature pour leurs propriétés d'auto-assemblage dans le cadre du nanopatterning de surface. Plus précisément, cette description concerne les copolymères à bloc, la cellulose et la chitine, l'ADN, les peptides et enfin, les protéines. Ceci permet d'avoir une vue d'ensemble sur :

- 1) Les différentes manières d'aboutir à un auto-assemblage *via* ces briques de base,
- 2) La morphologie de ces auto-assemblages,
- 3) La taille de leurs motifs.

Enfin, au-delà de la nature de ces auto-assemblages, nous avons décrit leur utilisation dans le cadre d'applications nanotechnologiques comme l'électronique, l'énergie et les biocapteurs. Le but est de mettre en perspective l'ensemble de ces auto-assemblages pour montrer l'intérêt de leur utilisation pour nanopatterner des surfaces pour ces applications.

## 1.2.2 Revue

### **To build or not to build: self-assembled porous lattices nanopatterning for electronics, energy and biosensing.**

The creation of a pattern on a surface has grown in interest over the last decades leading to a wide range of technological applications from DNA biochip to microelectronics. Nanopatterning a surface allows a tight control of the surface's topology to create nanometric features over a length scale from few nanometers to micrometer. The creation of nanoscale motifs on a surface is attractive for technological fields covering microelectronics, photovoltaic, biosensors but also biomedical. Benefits between flat surface and nanopatterned ones are well known as topographic modifications of a planar surface induces an enhancement of the surface specificity. The challenge in here is to decrease the size of the motifs printed on the surface in order to improve the nanotechnological devices sensitivity. From a technology perspective, this lead, for example, to a better detection of pathogens, a better cell adhesion, a better light absorption or electron transmission, and less energy consuming devices.

The achievement of a nanopatterned surface can be done thanks to multiple ways, divided into two main groups: top-down and bottom-up approaches. Like a sculptor who carves a statue from a block of stone, in the top-down methods, nanopatterning comes out of a flat surface sculpt. As an example of top-down method, extreme ultraviolet can be cited, as it is the mostly used technic in industry to nanopattern surface<sup>14</sup>. In this technic, 13.5 nm photons are focused thanks to mirrors to illuminate a mask. This mask allows a projection of an image on a substrate coated with a photoresist leading to the transfer of the pattern. The surface is then hollowed out with a pattern down to 20 nm. Going into deep into that top-down technic and through all the other ones are beyond the scope of this review. Details can be found in these previous published reviews<sup>15,16</sup>. It is important to keep in mind that the current 5 or 3nm technology commercialized is not fully related to the effective size pattern engrave on the substrate. For example, a 5nm technology is correlated to a size pitch (*i.e.* distance between two neighbors' motifs) of 36 nm<sup>12</sup>. Despite the improvement of all the top-down methods to get even smaller pitch pattern (*i.e.* sub 20nm) to fit requirements for nanotechnological uses, we are reaching physical limitations leading to the creation of defects in the motif formed on the surface.

At the opposite of the top-down technics, bottom-up approaches have emerged. These methods are analog to construct games such as Lego® bricks. They rely on the nanometric organization of small building blocks to create structures that are more complex based on the chemical properties of the building blocks. Here, building blocks are defined as the smallest unit allowing the construction of the nanostructure. They can be either man-made such as block copolymers or found in nature including biological polymers, DNA and protein. Starting from the bottom to the top allow quasi-atomic control of the nanopatterning making bottom-up good candidates to i) decrease the pitch pattern size and ii) resolve the defects effects. Beyond the inherent properties of each used building block, their self-assembly are essential to get a well-arranged lattice.

The principle of self-assembly process is the spontaneous organization of randomly distributed molecules in stable structures. The formation of a self-assembled material relies on the chemical and physical properties of the building blocks. Each mechanism of interaction between the building blocks is based on various atomic interactions<sup>17</sup>. Weak interactions such as Van der Waals forces play a fundamental role in supramolecular interaction so do the hydrogen bonds. Building blocks can contain aromatic rings that interact *via*  $\pi$ - $\pi$  interaction leading to self-assembly process. The environment in

which building blocks can also affect the self-assembly through hydrophobic interaction or metal coordination. Similarly, when building blocks are charged (either positively or negatively), repulsive or attractive forces are involved leading to electrostatic interaction. In the self-assembly process, the strength of the driven forces is below the strength of covalent bonds<sup>18</sup> leading to more versatile but also fragile structures. Thus, all these self-assembly mechanisms can be modulated by diverse external stimuli<sup>19</sup>.

Historically, one of the first self-assembled phenomenon observed and used is Self-Assembled Monolayer (SAM). In this process, building blocks are composed of two parts: a head and a tail and can be compared to lipid molecule. The head part will interact with the surface by chemisorption while the tail part will spontaneously organize with neighboring tail part leading to a packed nanostructure<sup>20</sup>. Moreover, these building blocks can be made with various chemical functions<sup>21</sup>. SAMs can structure a surface with a layer of few nanometers (*i.e.* the height of the building block). These layers are usually used as a template to functionalize other molecules leading to complex architectures piled up. Many applications come from SAMs-based nanomaterials from solar cell<sup>22</sup> to biomarkers detection<sup>23</sup>.

Nowadays, more and more nanomaterials are designed to create lattices with controlled size and motifs features instead of aperiodic monolayers. The advantages of the self-assembled materials are the diversity of the shape lattice formed when the building blocks are self-assembled and also their ability to be directly functionalized. From an engineering aspect, these self-assembled lattices have to i) reduce the pitch pattern size unreachable with top-down techniques and ii) depict large area covering to compete with top-down techniques<sup>24</sup>.

In this review, we describe the different building blocks and their subsequent lattices used for the nanopatterning of surfaces. Applications of the formed nanomaterials in nanotechnological field will also be highlighted. In the first section, lattices coming from chemical (*i.e.* block copolymers) and biological (*i.e.* cellulose and chitin) polymers will be outlined. Then, nanostructures based on DNA, protein and peptide will be described. The purposes of the section is i) to give details about the methods used to self-assemble the building blocks ii) to emphasize on the characteristics dimensions (*i.e.* pitch and/or area covered) of the structure when these data are available. The second section of this review will be focused on the nanotechnological applications coming out of the self-assembled nanomaterials in the last 5 years. These applications are covering electronics, the production or the storage of energy as well as biosensors.

## **1. Design a self-assembly for lattice creation: a wide diversity of building blocks**

### **1.1. Polymers as Build Blocks**

Polymers are long chain of macromolecules composed by covalently linked repetitive motifs called monomers. They are branched or linear depending on monomer sequence. Self-assembly of polymers relies on the supramolecular interaction between each polymer. Supramolecular interactions between the polymers occur naturally or can be driven by addition of appropriate molecule directly in the polymer sequence. Nowadays, polymers are part of our everyday life. They can be encountered in biomedical field<sup>25</sup>, in fuel cells<sup>26</sup> and in others<sup>27</sup>. They can be either rationally designed by men, like block-copolymers or naturally found on earth, like cellulose or chitin. Whether they are natural or chemical, polymers have several advantages: they are simple to produce, inexpensive and their mechanical as well

as chemical properties are adjustable. Moreover, they can be easily functionalized<sup>28</sup>. Based on these properties, they have been studied for years as a scaffold to create nanostructures onto surfaces<sup>29</sup>.

### 1.1.1. Synthetic Polymers: Block-Copolymers

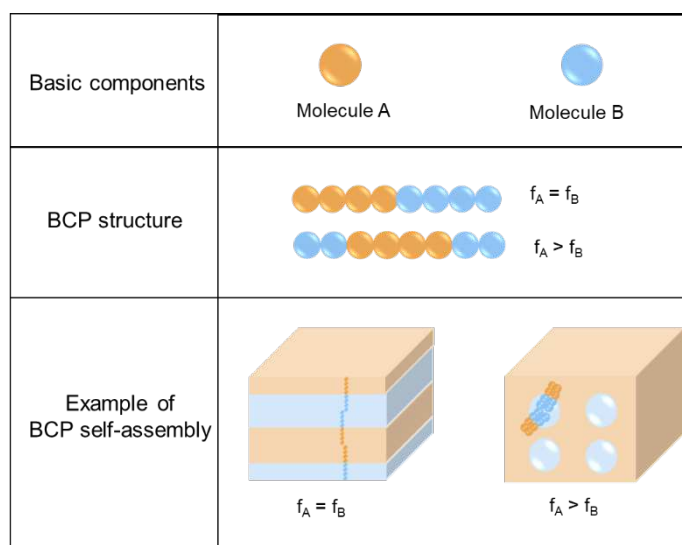
#### 1.1.1.1. Synthesis and Characteristics of BCP

For over 60 years, block-copolymers (BCP) have been studied worldwide. Between 1952 and 2021, more than 45 000 publications have been published on this topic making it a well-known technology<sup>30</sup>. Over the years, interest for BCP has grown as they are easy to synthesize and they self-assemble into nanodomain making them promising materials for nanotechnological applications<sup>31</sup>. These polymers are made of two or more distinct chain called “block” covalently linked. Each block is composed by multiple repetition of one monomer (Figure 1). The polymers are usually called diblock copolymers<sup>32</sup> when they are composed of two different blocks (named A and B). BCP can also be formed by more than two blocks<sup>33</sup>.

The synthesis of the BCP relies on the sequential addition of the blocks<sup>34</sup>. One of the strategies for this synthesis is to protect the ends (*i.e.* the monomers at the BCP extremities) of the BCP in order to allow or not polymerization to happen. To do so, free radicals can be formed in atom transfer radical polymerization<sup>35</sup> leading to irreversible polymerization. Noteworthy, a reversible method has also been developed in a two-step addition<sup>36</sup>. Another strategy called living anionic polymerization<sup>37</sup>, which is mostly used in industrial processes, relies on difference of reactivity between the block without needing termination or chain transfer. All these methods result in the creation of linear or a branched BCP (Figure 1) in which each block has specific chemical characteristics depending on its molecular composition.

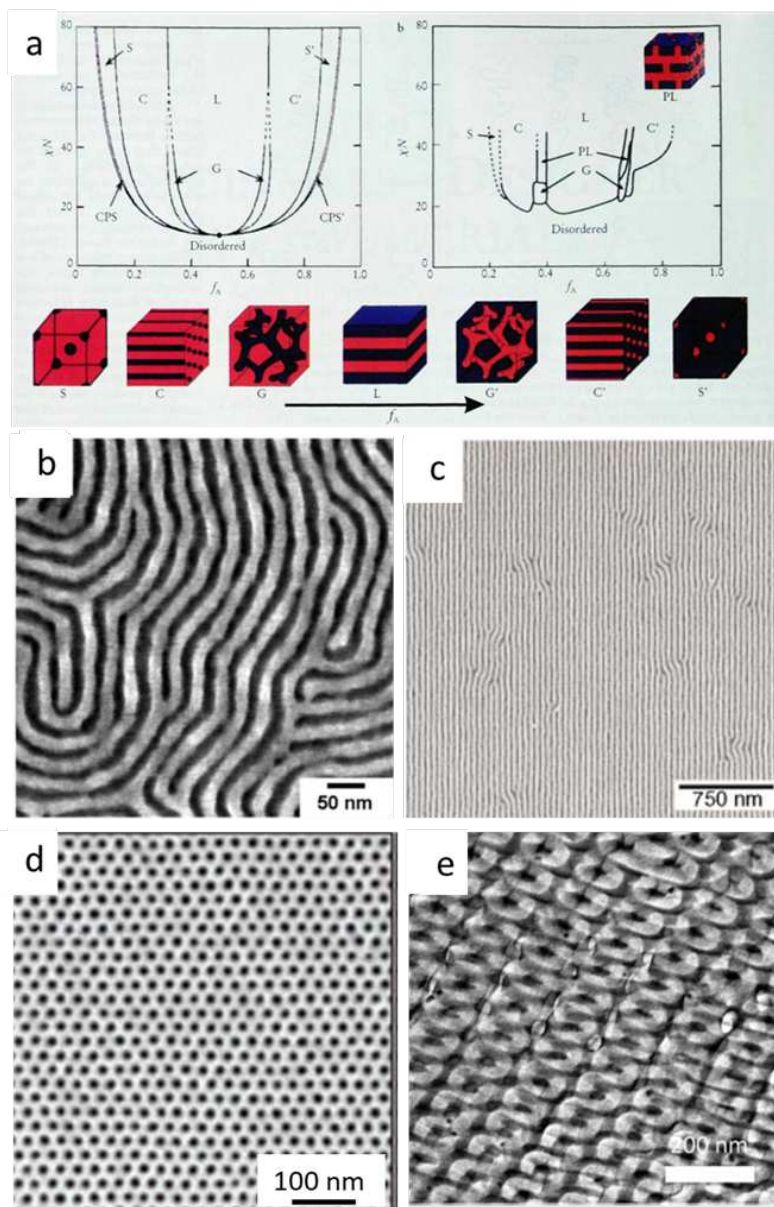
#### 1.1.1.2. Self-Assembly Mechanisms of BCP

When two molecules with non-compatible chemical properties are putting together in a solvent, phase separation occurs comparable to oil and water. In BCP, the covalent link between the two blocks leads to microphase separation. Indeed, to minimize entropic energy, BCP will be organized to promote local interaction between blocks A and between blocks B resulting in domains at the nanoscale (Figure 1).



**Figure 1.** Schematic representation of self-assembled diblock copolymer. Thanks to two different basic components, a great diversity of BCP structures are obtained. Depending on the volume fraction ( $f$ ), natural microphase separation will lead to characteristic self-assemblies morphologies.

BCP self-assembly abilities can be modulated depending on many parameters such as the Flory-Huggins parameter ( $\chi$ ) describing the interaction between the blocks, the number of repetitions of the motifs ( $N$ ) and the volume fraction ( $f$ ) (Figure 2.a). By tuning these parameters, various macromolecular morphologies can be obtained such as lamellae<sup>38</sup> (Figure 2.b and c), cylinder<sup>39</sup> (Figure 2.d) and others (Figure 2.e). These morphologies can be predicted if  $N$ ,  $\chi$  and  $f$  are known<sup>40</sup>. In a diblock copolymer AB, if the volume fraction of A and B are the same, the copolymer will adopt a lamellar morphology. If  $f_A$  or  $f_B > 1/2$ , changes in the block interaction occur leading to a spherical morphology<sup>41</sup>.



**Figure 2.** BCP are able to adopt various morphologies. **a.** Phase diagram for diblock copolymer in theory (Left) and experimental phase (Right) for poly(isoprene-styrene). The y-axis represents the combination of the  $\chi$  and  $N$  parameter. The x-axis is the volume fraction ( $f$ ). Each letter in the diagrams references to the schematic representation of the different phases below. Adapted from Reference<sup>42</sup>. **b.** Lamella morphology of PS-b-PMMA. Adapted from Reference<sup>43</sup>. **c.** Symmetric lamella morphology of PS-b-PMMA. Adapted from Reference<sup>44</sup>. **d.** Cylindrical morphology of PS-b-PMMA. Adapted from Reference<sup>45</sup>. **e.** Gyroid morphology of PS-b-PDMS. Adapted from Reference<sup>46</sup>.

BCP micro phase separation<sup>47</sup> occurs in solution but also at the interface of a surface resulting in a film formation<sup>48</sup>. After nanodomains organization, the BCP film is annealed either thermally<sup>49</sup> or with a solvent<sup>50</sup> leading to mesoporous material with defined morphologies. By tuning precisely the characteristics parameters of the block copolymers, a plethora of structure<sup>42,51</sup> can be achieved. Interestingly, Son *et al.*<sup>52</sup> showed a coexistence between a 18 nm pitch point pattern and lines of 9 nm wide in the same BCP mesoporous material.

Taking these considerations altogether, BCP can naturally self-assemble into film on the surface but this leads to many dislocations in the pattern. Indeed, due to a slow self-assembly kinetic, structural defect occurs<sup>53,54</sup>. To overcome this issue, in the last 10 years, the focus in that field has been to direct the self-assembly<sup>55</sup>.

### 1.1.1.3. Directed Self-Assembly of BCP

The main goal in directed self-assembly (DSA) of BCP is to promote the orientation of the polymer by means of physical and chemical processes. Depending on the DSA technic used, disruption in the micro phase separation of the BCP occurs leading to a more well-defined mesoporous material.

The quality improvement of the BCP lattices has been explored through advanced thermal annealing processes. Instead of heating both substrate and BCP to get the mesoporous structure, a local heating thanks to a laser is applied. If a BCP is heated above his order-disorder temperature, less defaults are formed<sup>4</sup>. Using this consideration, Leniart *et al.*<sup>56</sup> proved, by combining extreme temperatures and short-time exposure, a 2-fold increase of the orientational order parameter to obtain a well-defined BCP self-assembled. Although the final structure of the BCP self-assembly can be predicted, Jin *et al.*<sup>57</sup> showed, with this laser technic, an ability to modulate the shape of the self-assembly from fingerprint shape to 8 nm pitch straight line. Noteworthy, Jin *et al.*<sup>57</sup> demonstrated the use of light to direct BCP self-assembly. In another way, Lee *et al.*<sup>58</sup> showed that preheating a BCP solution before spin-casting leads to a straight lines pattern instead of a fingerprint pattern.

Despite all the improvements made in thermal annealing process, strong physical interactions occur at the interface between the surface and the polymer resulting in a disordered thin layer<sup>59</sup>. This layer destabilizes the equilibrium of the BCP film<sup>60</sup> and is also leading to structural defects. To avoid this, air/water interfacial self-assembly is used to create a stable and irreversible thin BCP film<sup>61</sup>. More broadly speaking, a pre-patterning of the surface either chemically<sup>62</sup> or topographically<sup>63</sup> and sometimes both<sup>64</sup> can be used to directed self-assembly of BCP. Chemical DSA of BCP is based on the affinity between a surface and one of the blocks. The surface will be functionalized with one of the basic component of the BCP thereby forcing the orientation of the BCP. Ruiz *et al.*<sup>45</sup> showed that a patterning substrate with a polystyrene (PS) brush increases the dot density by 2-fold in the pattern and, in addition, defaults are reduced by a half. However, depending on the closeness of the chemical surface functionalization, BCP pattern can dislocate<sup>65</sup>. Typically, if the size of the chemical pattern is equal to the size of the corresponding block, inconsistent assembly of the other blocks occurs. To overcome this issue, Cushen *et al.*<sup>66</sup> develop a method of double patterning to constrain the orientation of each block of a diblock copolymer. Unlike chemical DSA, the aim of topographical DSA is to use top-down method to prepattern shapes on the surface to compel BCP self-assembly inside this physical pattern. Surface can be structured in different ways. First, Electron Beam Lithography (EBL), in combination with PS functionalization, is commonly used to do DSA. This allows, for example, hexagonal shapes made by EBL which are filled with circular BCP pattern<sup>52,67</sup>. In the same way, Nanoimprint Lithography (NIL) was used to create parallel lines of 20 nm spaced to directed self-assembly of BCP<sup>68</sup>. In some cases, if the pre patterned lines are too closed (60 nm), pattern dislocation occurs<sup>69</sup>. Noteworthy, if too many defaults are in the pattern, a new cycle of NIL-DSA can be done to repair the self-assembly<sup>70</sup>.

Interestingly, Lane *et al.*<sup>71</sup> showed a 5 nm pitch lamellae shape thanks to a NIL patterning and chemical DSA.

Beyond the chemical and/or physical modification of the surface to drive BCP self-assembly, external stimuli have also demonstrated great efficiency in directed their self-assembly. Subject BCP to electric field changes the charge of the BCP resulting in the modulation of the self-assembly. Interestingly, the use of an electric field to direct self-assembly also leads to a change in the BCP self-assembled shape<sup>72</sup>. It has been shown that either magnetic<sup>73</sup> or electric<sup>74</sup> field can direct the BCP self-assembly.

#### 1.1.1.4. Conclusion

BCP have been extensively studied leading to various strategies to synthesize them, to tune their self-assembly morphology but also to direct their self-assembly. One of the best advantages of the BCP is the diversity of the nanostructures including fingerprint, point, line but also their tunability. In a broad sense, BCP technology is in good place to compete with top-down technics with pitch pattern typically down to 20 nm. However, BCP are most of the time synthesized, dissolved and sometimes annealed in non-environmentally friendly solvents. Nowadays, green chemistry<sup>75</sup> concept drives researchers to look other way to find suitable materials matching at least the third of these principles. The purpose is to find not only a new process less hazardous for the environment but also to use inherent safer base products.

### 1.1.2. Carbohydrate Based Biopolymers: Cellulose and Chitin

Carbohydrate based biopolymers have several advantages over the chemical ones. First, they are biodegradable but also biocompatible and renewable which made them good candidates for new nanomaterials. Secondly, they are naturally abundant on Earth. Worldwide, 100 billion tons of cellulose are produced by nature itself in one year. For chitin, this is between 10 and 100 billion tons<sup>76</sup>. This natural production is an enormous advantage from a technological point of view: it reduces the cost of these building blocks and so the cost of the developed devices. Moreover, studies have also shown that these polymers are even or more resistant than current materials such as steel<sup>77</sup>.

#### 1.1.2.1. Self-assemblies of cellulose

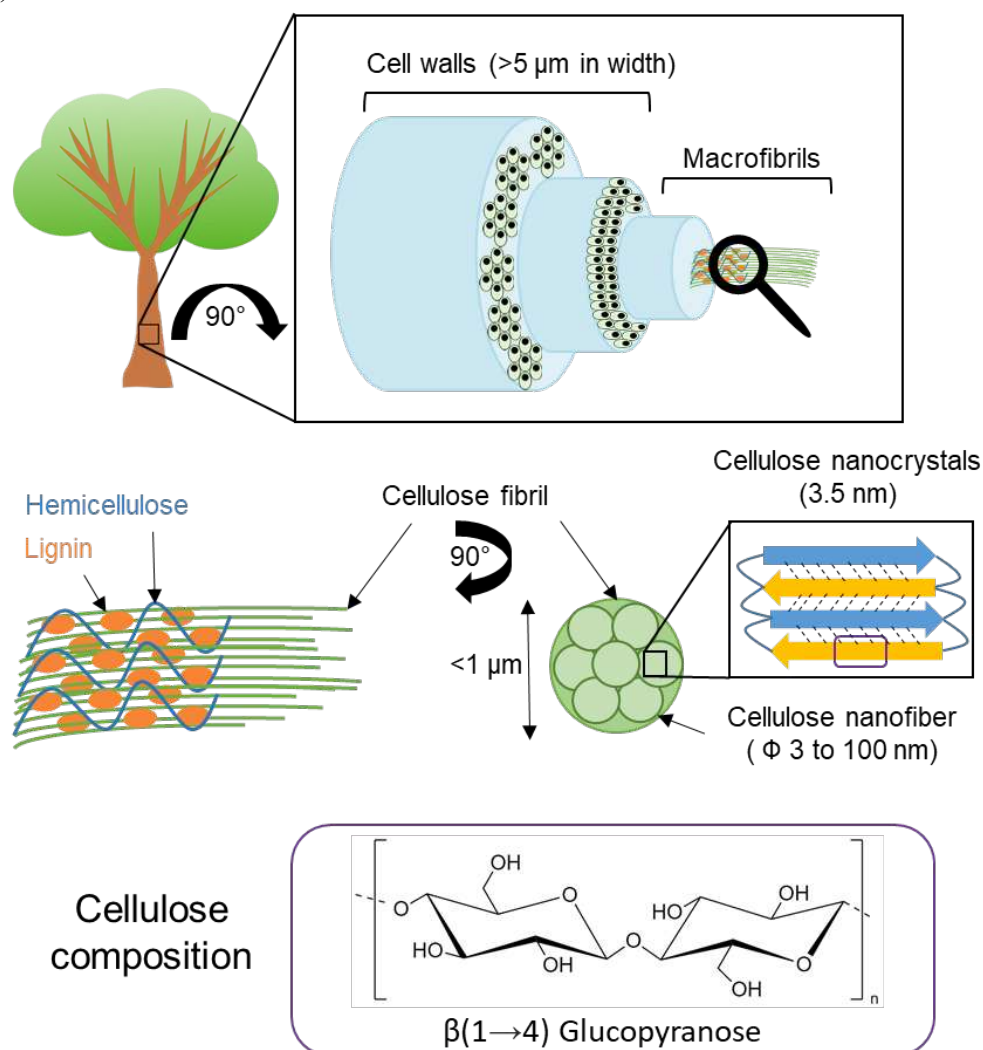
##### 1.1.2.1.1. Main Characteristics of Cellulose

Cellulose is the most abundant biopolymer on Earth and easily found in wood<sup>78</sup> or even in bacteria<sup>79</sup>. For these organisms, cellulose provides both support and protection. In its natural state, cellulose is at the same time fibrous and crystalline. At the macroscale level, cellulose is interlocked with lignin and hemicellulose forming macrofibers depicting a diameter from 5 to 20  $\mu\text{m}$  (Figure 3). Going deeper at the microscopic level, cellulose is a fibril containing packed nanofibrils. Inside these nanofibrils, there are ordered region (*i.e.* crystalline) and disordered region (*i.e.* amorphous)<sup>80</sup>. The difference between ordered and disordered regions relies on the H-bonds formed by the linear  $\beta$ -D-glucopyranose chains: the buildings blocks of cellulose. If two glucosidic chains interact together through H-bond, it will lead to a crystalline region called cellulose nanocrystals. In the disordered region, the glucosidic chains will also forme H-bonds but this time with water or other molecules. This ability of cellulose to self-assemble has been exploited to make useful biomaterials for nanotechnology. Beyond this capacity, the presence of the hydroxyl group in the structure allows cellulose chemical modification for various applications<sup>81</sup>.

### 1.1.2.1.2. Self-Assembly of Cellulose: Nanocrystal and Nanofiber

When cellulose is subjected to sulfuric acid hydrolysis, disordered regions are dissolved and rod-like shapes discrete appear<sup>82</sup>. These discrete cellulose particles are known as cellulose nanocrystals (CNC) (Figure 4.a). In solution, CNC self-assemble in a long-range orientation with a helicoidal twist depending on the alignment direction: they adopt a characteristic chiral nematic structure, *i.e.* liquid-crystalline arrangement. The cellulose source from which they are extracted will determine their length (from 100 to 1000 nm) and their width (from 3 to 50 nm)<sup>83</sup>.

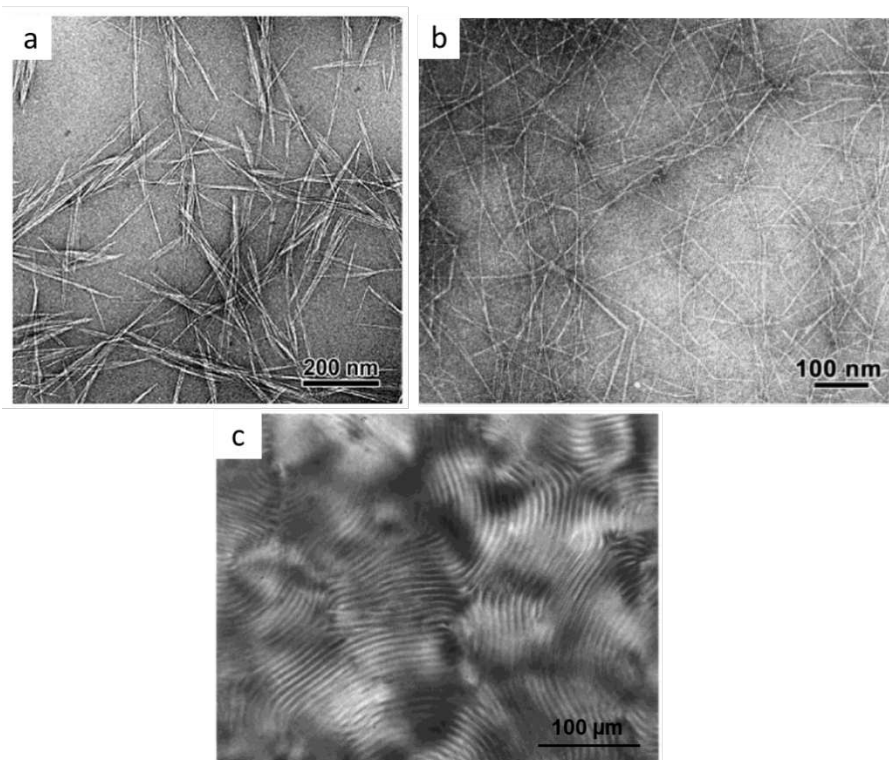
Interestingly, depending on the cellulose source, CNC self-assemblies haven't the same mechanical and optical properties<sup>84</sup>. To evaluate the resistivity of the CNC based nanomaterials, elastic modulus, *i.e.* their ability to resist mechanical deformation without permanent sequels, is measured. Noteworthy, the tensile strength (*i.e.* the maximal strength that can be applied to a material without altering it) of CNC is almost twice steel one's<sup>85</sup>.



**Figure 3.** From biomass to cellulose atomic composition. Schematic representation of cellulose organization starting from tree cell walls down to cellulose smallest composition unit: glucose.

In contrast, when cellulose fiber is subjected to mechanical shearing, cellulose nanofiber (CNF) are extracted (Figure 4.b). CNF are filaments networks with width from 3 to 100 nm and length greater

than  $1\ \mu\text{m}$ <sup>86</sup>. Due to lower crystallinity, CNF elastic modulus, is less than CNC one's. As CNC, length, width and properties depend on the cellulose source from which CNF are extracted<sup>87</sup>.



**Figure 4.** Cellulose is able to self-assemble in different morphologies. **a.** Cellulose nanocrystals (CNC) from eucalyptus wood pulp visualised in TEM. Adapted from Reference<sup>82</sup>. **b.** Cellulose nanofibers from bleached sulfite wood viewed in TEM. Adapted from Reference<sup>86</sup>. **c.** Fingerprint morphology obtained with cellulose carboxylated microcrystals visualised in TEM. Adapted from Reference<sup>88</sup>.

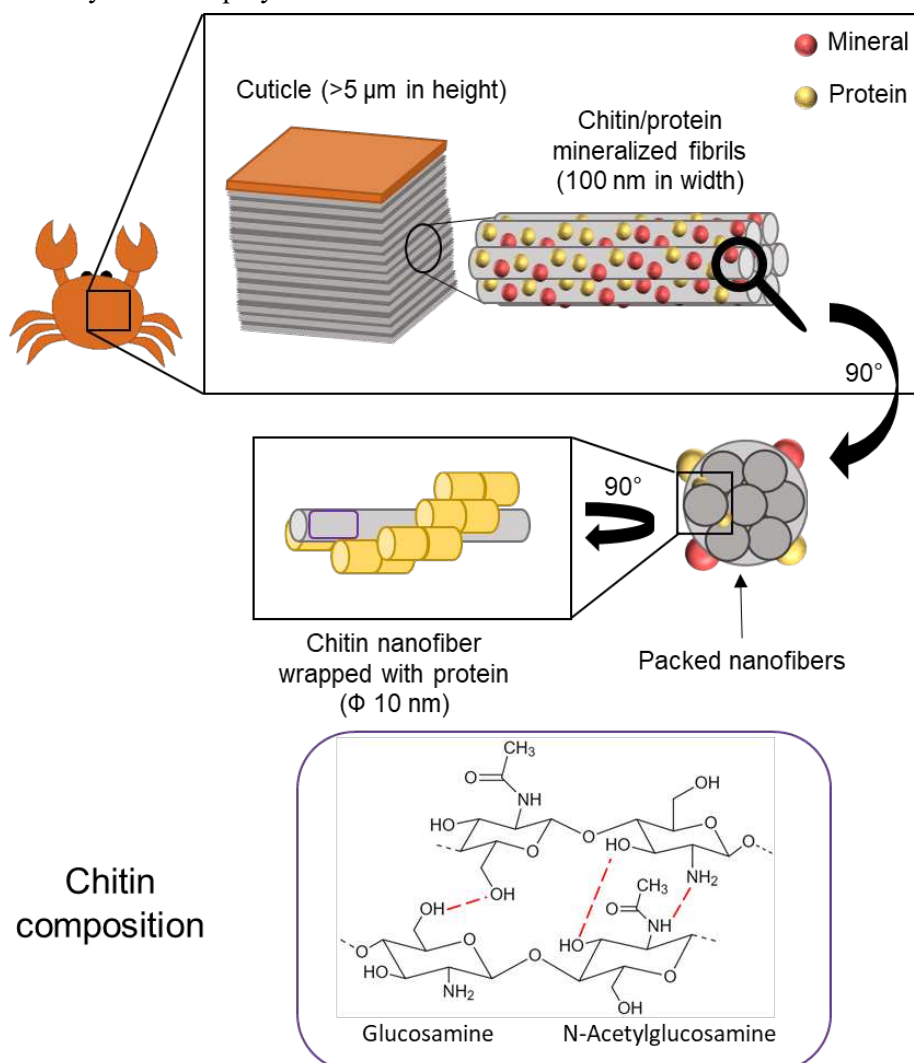
#### 1.1.2.1.3. Modulation of Nanomaterials-based Cellulose Self-assembly

Once nanocrystals and nanofibers are extracted from native cellulose, they still keep their ability to reassemble. Nowadays, the research focus is on the control of this supramolecular reorganization. Solvent evaporation leads to CNC self-assembly on the surface, but discontinuous crystal domains are formed. To overcome this issue, technic such as Langmuir Blodgett allowing the creation of a thin film can be used<sup>89</sup>. It is known that electric field change the charge properties of molecules in solution. Habibi *et al.*<sup>90</sup> showed that depending on the chemical environment of the CNC, their organization will be more or less permissive when they are under an alternative electric field. Interestingly, CNC obtained from acid hydrolysis will be oriented in the same direction as the electric field. If the field is not strong enough ( $2000\ \text{V/cm}$  and  $<10^4\ \text{Hz}$ ), CNC are aggregated because the repulsive forces between the CNC can't counter the electric field CNC self-assembly can also be directed by a magnetic field of  $7\ \text{T}$ <sup>91</sup>. In that case, CNC will be orientated perpendicular to the field<sup>92</sup>. Generally, self-assembly abilities of cellulose nanostructure can be modulated through a cross-linking strategy to get dense and packed layers<sup>93</sup> or through carboxylation followed by PEGylation to get a fingerprint pattern<sup>88</sup> (Figure 4.c).

### 1.1.2.2. Self-assemblies of chitin

#### 1.1.2.2.1. Generalities on Chitin

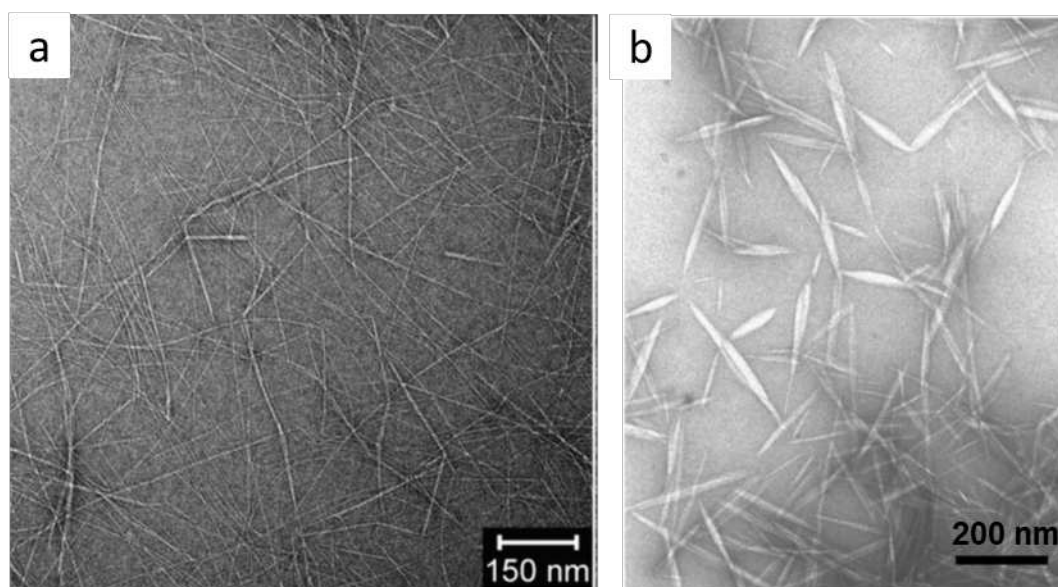
Chitin is a natural amino polysaccharide found in crustaceans shell, insects or in fungi cell walls<sup>94-96</sup>. In nature, chitin acts as structural part for these living organisms and it is the second most abundant biopolymer on earth. From a macroscopic point of view, chitin is not found pure but in complex with proteins and minerals. The proportion between chitin, protein and minerals depends on the biological origin. Down to the nanometric scale, chitin nanofiber is still wrapped with protein. At the molecular scale, it is composed of two building blocks: glucosamine and N-acetyl-glucosamine linked through a ( $\beta$  1-4) glycosidic bond (Figure 5). The proportion between these two building blocks is related to the chitin source. If there are fewer than 35% of N-acetyl-glucosamine (also called degree of acetylation), chitin is called chitosan<sup>97</sup>. Due to their composition, these biopolymers are composed of hydrophobic and cationic sites. Chitin and chitosan self-assemblies are mainly mediated by the hydrophobic sites but also by the intern hydrogen bonds between OH and NH<sub>2</sub>. Molecular weight and acetylation degree influence the self-assembly by modulating the charge density, the hydrophobicity and so the solubility of the biopolymer<sup>70</sup>.



**Figure 5.** Natural chitin structure from arthropod sources. Schematic representation of chitin starting from arthropod cuticle down to chitin smallest composition units: Glucosamine and N-Acetylglucosamine. The red dotted lines are corresponding to H bonds.

### 1.1.2.2.2. 2D Nanomaterials Based Chitin

Nanomaterials based chitin are obtained mainly from chitin acid hydrolysis<sup>98</sup> or TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) oxidation<sup>99</sup> leading to the formation nanofibers<sup>100</sup> (Figure 6.a) or whiskers<sup>101</sup> (Figure 6.b). Nanofibers vary from ten to several hundred nm in width and can reach micrometer in length. Whiskers, for their part, are crystalline part of the nanofibers. These rod-like particles, obtained after chemical treatment of nanofibers, as an average width of 8 nm and an average length of 200 nm<sup>102</sup>. By analogy to cellulose, the whiskers are also called nanocrystals. Once dissolved in a solvent, nanocrystals adopt a chiral nematic liquid-crystalline arrangement leading to the formation of thin film after solvent evaporation<sup>103</sup>. Historically, electrospinning of chitosan solution was used to create chitosan fibers<sup>104</sup>. Depending on how nanomaterials-based chitin are extracted, they don't have the same properties<sup>76</sup>. Interestingly, Fan *et al.*<sup>105</sup> have shown that based on the solvent of chitin nanosuspensions, either aggregates or discrete uniform nanocrystals are formed. Whereas nanomaterials-based chitin can easily be self-assembled, it remains poorly tunable. Methods have been developed to modulate the nanostructure of chitin or chitosan 2D materials.



**Figure 6.** Chitin nanostructures. **a.** Chitin nanofibers isolated from squid pen viewed in TEM. Adapted from Reference<sup>106</sup>. **b.** TEM image of TEMPO-oxidized chitin from crab shells forming whiskers nanostructure. Adapted from Reference<sup>107</sup>.

### 1.1.2.2.3. Modulation of the Self-Assembly

Due to the presence of  $\text{NH}_2$  and  $\text{OH}$  groups, nanomaterials-based chitin can naturally chelated metals<sup>108</sup>. Wang *et al.*<sup>109</sup> showed that depending on the nature of the metallic cation and its concentration, modulation in the roughness of the chitosan film formed is observed. However, if the cation concentration is low (0.02 mg/mL), roughness of the film is higher than when no cation is used. Holes in the thin film appear when the cation concentration is higher than 1 mg/mL. Interestingly, You *et al.*<sup>110</sup> have shown a stacking of chitosan layers mediated by hydrophobic interaction between the layers.

One of the major methods to create a stacking of multiple polymers layers is called layer-by-layer<sup>111</sup> (LbL). This technic relies on the successive adsorption of oppositely charged thin layers of polymers a surface. Naturally, chitosan nanofibers are positively charged thanks to amine groups. Using poly(acrylic acid) (PAA) as anionic polymer, Manabe<sup>112</sup> showed the formation of chitosan/PAA porous film via LbL method. Interestingly, thanks to silk fibroin, a protein, Nogueira *et al.*<sup>113</sup> showed that a bidirectional orientation of chitosan film is possible.

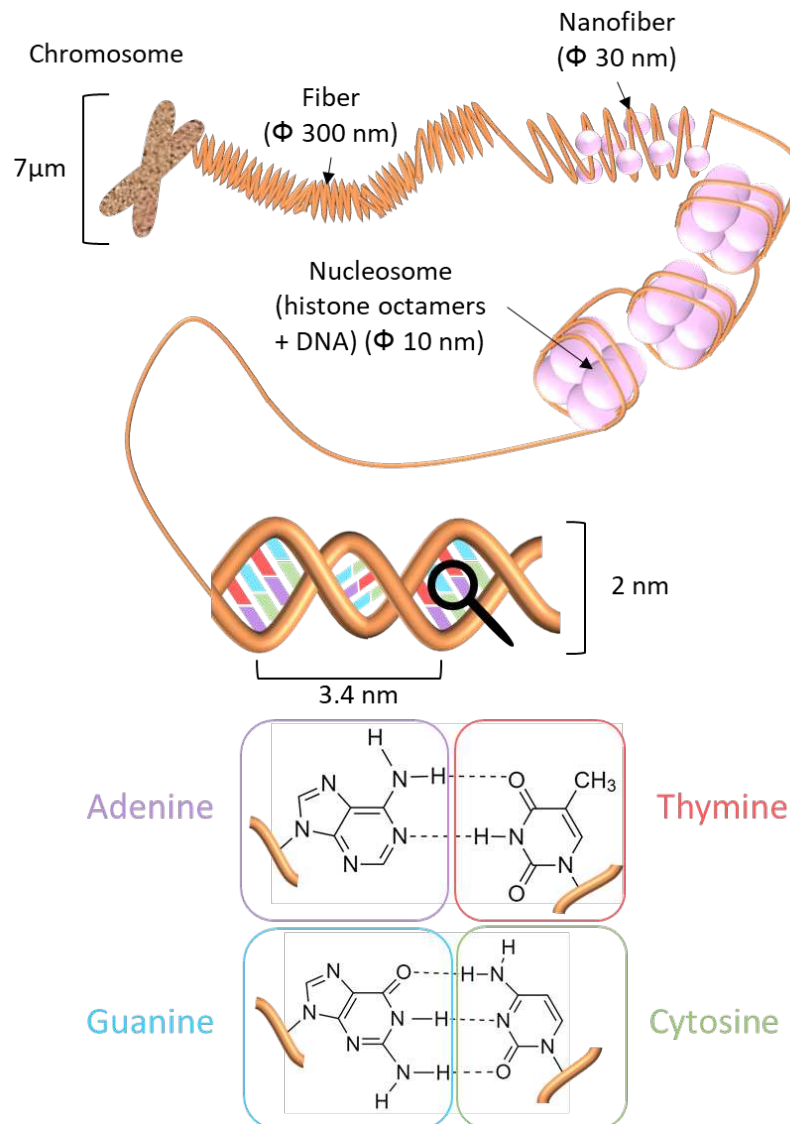
### 1.1.2.3. Conclusion

Self-assemblies based on cellulose or chitin are easily obtained and the availability of these biopolymers make them suitable materials to create nanostructures fitting some of the green chemistry principles. Although surfaces covered by these polymers is impressive (often beyond the centimeter scale), there is a lack of precise hierarchical structure due to organizational limitations of the basic components. Thereby, the shape of the cellulose and chitin based nanostructures are not as tunable as BCP and so less suitable from a nanopatterning standpoint. Ideally, the versatile self-assembly capabilities of the BCP and the natural source of the biological polymers should be combined.

Beyond the two biological polymers presented above, Nature offer a wide diversity of other biological building blocks presenting self-assembly abilities including DNA, protein and peptides<sup>114</sup>. For decades, their dynamic abilities of interaction have been fundamentally studied but also switched to create new nanomaterials for nanotechnological purpose<sup>115</sup>. From a technological standpoint, these buildings blocks remain naturally sourced, cheap and easy to get paving the way to more environment friendly and accessible technologies.

## 1.2. Deoxyribonucleic Acid as Building Blocks

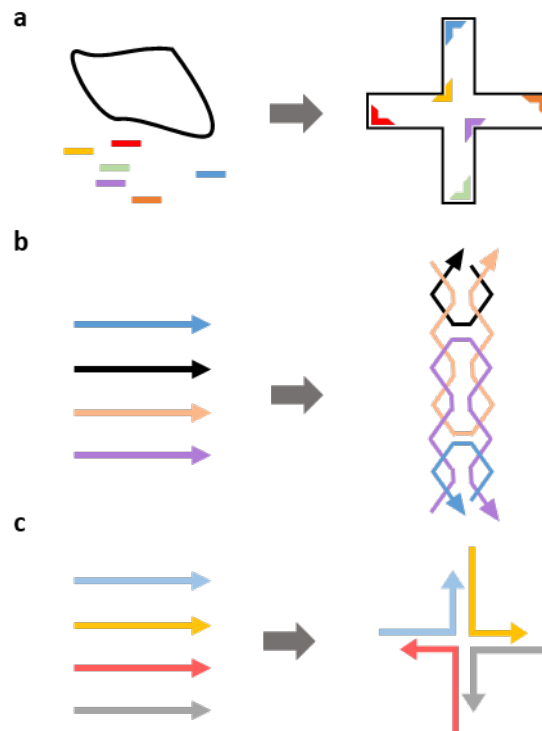
DNA is one of the key elements for living organisms to function. It is the support for genetic information condensed in chromosome at the macroscopic scale. When chromosome is unwound, the organization of DNA at the nanometric scale is revealed: it is bundled with histone in a structure called nucleosome (Figure 7). Its building blocks are the nitrogenous bases Adenine (A), Thymidine (T), Cytosine (C) and Guanine (G) associated with pentose sugar linked through a phosphoryl bond. DNA is well-known for its natural abilities to self-assemble into a double-helix structure thanks to the base pairing principle of Watson and Crick<sup>116</sup>. In this principle, each base (A and C) can specifically interact with another one (respectively T and G) which leads to the recognition between two complementary DNA strand and the double helix shape. With its 2 nm diameter and its 3.4 nm (corresponding to 10.5 base pair) helix pitch, DNA is studied for years as a biomaterial. On the one hand, the nanometric dimensions of the double-stranded DNA is attractive for nanotechnology. On the other hand, the natural recognition between the base pair makes DNA a versatile and programmable material.



**Figure 7.** From chromosome compaction to DNA smallest composition units: nitrogenous bases.

### 1.2.1. DNA 2D Nanostructures

Pioneering work on the structure of DNA for nanotechnology purposes dates from the end of the 20th century. Later, Rothemund<sup>117</sup> showed for the first time a unique way to self-assemble M13 bacteriophage DNA in a desirable and programmable shape called origami. M13 bacteriophage DNA is reticulated thanks to short and complementary DNA sequence called “staples” (Figure 8.a). While the use of staples is crucial to achieve 2D DNA array, punctual height difference can be achieved by incorporate hairpin DNA in the pattern. Noteworthy, this work presents more than ten different nanostructures such as smiley, stars or squares with dimensions of 100 nm. The specific recognition between the staples and the M13 DNA is not the only key point to get DNA nanostructures. Halley *et al.*<sup>118</sup> showed that depending on the way DNA is cooling down, the fabrication yield of the nanostructure varies. One of the drawbacks of using the M13 bacteriophage DNA is that for a single structure, hundreds of different staples are required and the entire strand is used. Pound *et al.*<sup>119</sup> showed that shorter synthesized DNA fragment through PCR can be self-assemble into letters with well-defined angles.



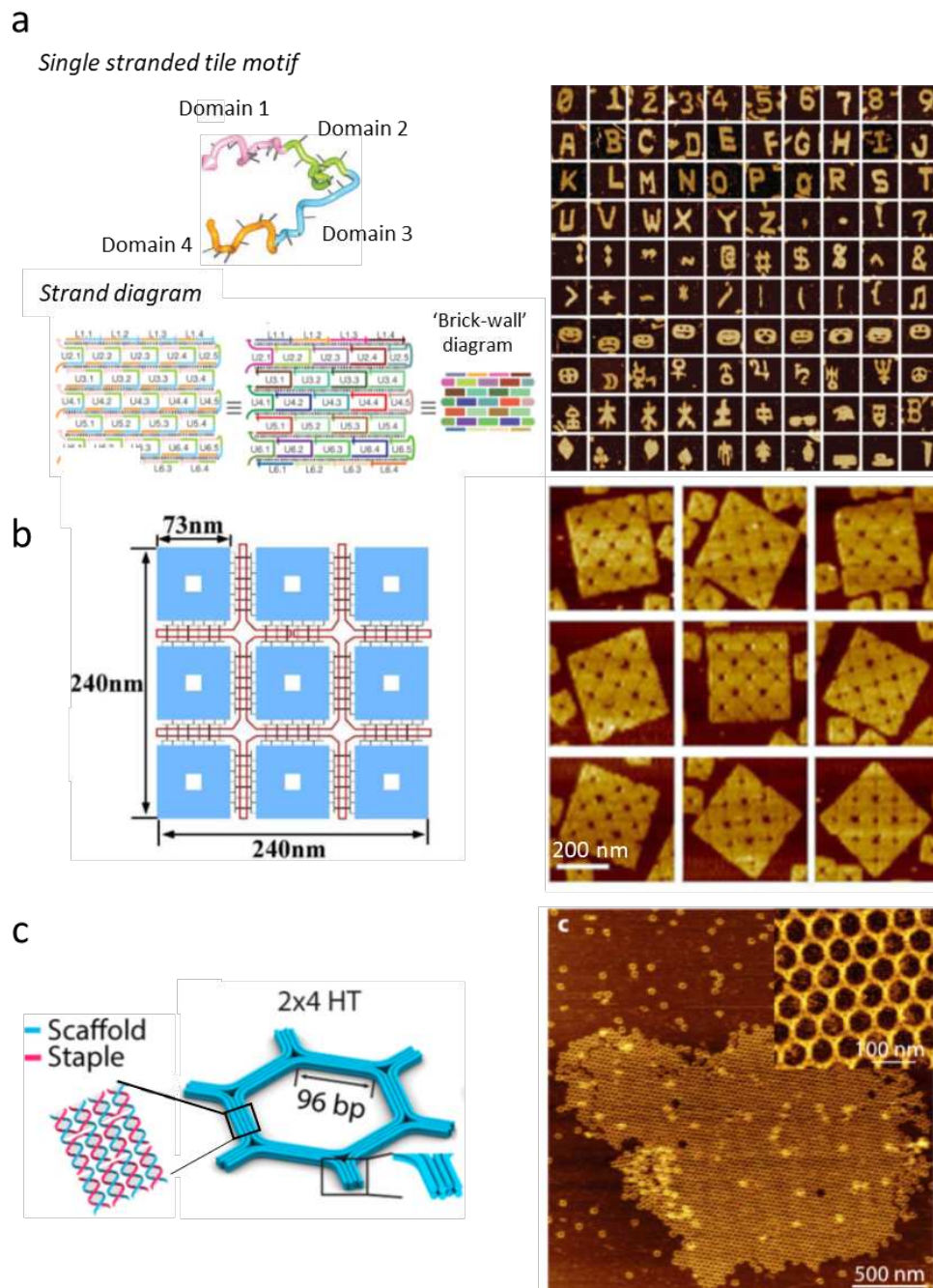
**Figure 8:** Schematic representation of DNA nanostructure based on (a) M13 bacteriophage circular DNA reticulated with staples (lines in color) (b) double cross over involving intertwined single stranded DNA (c) Holliday junction involving complementary DNA single strand.

The works described so far are based on a single strand DNA shaped through shorter single strand. However, the natural abilities of double-stranded DNA to crossover have also been used (Figure 8.b). Classically, in DNA nanostructures, crossovers can be created between two or three double-stranded DNA<sup>120,121</sup>. Interestingly, by tuning the number of half-turn in the helices, double crossover leads to aperiodic structure<sup>122</sup>. Rather than using two long double-stranded DNA to crossover, single stranded DNA with complementary domains can be used. A huge advantage over classic origami DNA is that only one type DNA strand is required to achieve Chinese characters as well as punctuation marks<sup>123</sup> (Figure 9.a). With double and triple crossover, DNA structure are more resistant without the requirement of the hundreds of different staples synthesis.

### 1.2.2. Large Array of DNA

M13 DNA with staples, double cross over or complementary single stranded DNA leads to the formation of various discrete shapes. However, a large array is required for nanotechnological applications<sup>124</sup>. Over the last years, efforts have been made to create DNA 2D arrays<sup>125</sup>. Zhao *et al.*<sup>126</sup> have demonstrated the possibility of self-assemble origami of origami (Figure 9.b). First, classic origamis with M13 bacteriophage DNA and corresponding staples are produced. Then, this origami is organized with another M13 DNA leading to hexagonal origami of triangle origami or square origami of square origami. Similarly, Wang *et al.*<sup>127</sup> created a 2D honeycomb lattice with a 50 nm pitch but covering an area of  $6 \times 9 \mu\text{m}^2$  (Figure 9.c). Woo and Rothmund<sup>128</sup> developed a binary system which consists of the succession of blunt ends ('1') and cohesive ends ('0') at origami side. This allows a specific recognition between the origami leading to array of zigzag or triangle. Rajendran *et al.*<sup>129</sup> also showed a puzzle way to assemble DNA origami in which a swelling is programmed to fill a hole. Interestingly, Tikhomirov *et al.*<sup>130</sup> designed a unique origami structure presenting "pixel positions" allowing a precise replicate of Mona Lisa painting paving the way for precise molecule grafting. Large scale ordering origami can also be achieved thanks to surface functionalization. On mica surface, Rafat

et al.<sup>131</sup> showed a  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  area filled with origami mediated through  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{NaCl}$  interactions while Suzuki et al.<sup>132</sup> used lipid bilayers to achieve a 60 nm pitch square pattern.



**Figure 9:** DNA based 2D nanostructures. Schematic illustration (Left) and AFM images (Right) of the nanostructures. **a.** DNA single stranded tiles. Adapted from Reference<sup>123</sup>. **b.** Square « origami of origami ». Adapted from Reference<sup>126</sup>. **c.** DNA-origami hexagon tiles (HT). Adapted from Reference<sup>127</sup>.

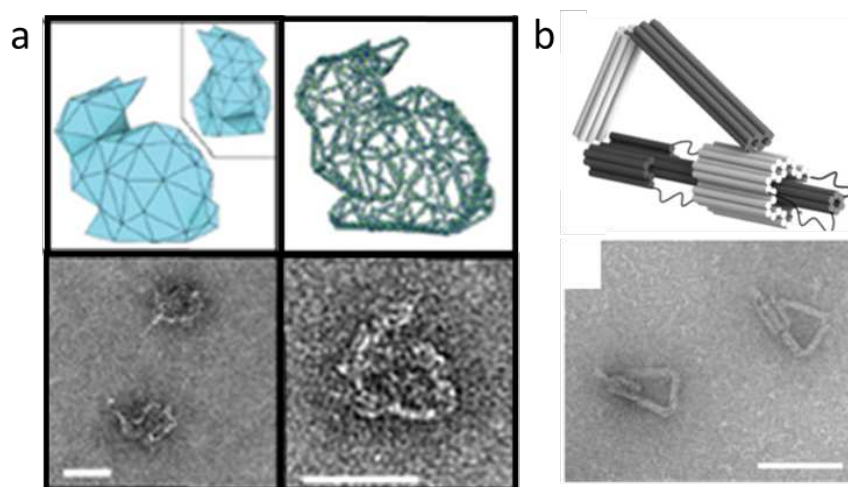
In other works, 2D arrays are achieved with shorter DNA strands. By using 4 complementary single DNA strands forming a cross with sticky ends (Figure 9.c), Malo et al.<sup>133</sup> formed a hexagonal structure with a reduced pitch of 15 nm. With a system of 9 oligonucleotides interlocked together, Yan et al.<sup>134</sup> achieved a 500 x 500 nm lattice with a 19.3 nm pitch. The drawback of such structures is the lack of possible changes in the lattice shape. More diverse nanostructures can be achieved by using T-junction. These structures are made by one double-stranded DNA molecule presenting a sticky end that interlock into a loop of a second double-stranded DNA to form a T-shape. Hamada and Murata<sup>135</sup> used

this principle to create arrays of ladder and wheel of  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  with a pitch of 10 nm while He et al.<sup>136</sup> showed a square lattice of 19 nm pitch covering more than  $10 \mu\text{m}$ . Tian et al.<sup>137</sup> went further in the T-junction process to create C and Z junction to increase the possibility of pattern shapes. Interestingly, Zhang et al.<sup>138</sup> showed that a square structure linked with a triangle through their vertices can self-assembled in 2D array with an area a  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  and a pitch around 25 nm.

### 1.2.3. Mobile and 3D Nanostructures

Beyond the diversity of shapes achievable in 2D with DNA, the remarkable ability of DNA to be precisely tune has also led to the emergence of 3D nanostructures. Douglas *et al.*<sup>139</sup> showed a 3D cylinder organization of a flat origami thanks to the use of long staples leading to a staple directed folding. By self-assemble DNA anti parallel 2D triangles, Ke *et al.*<sup>140</sup> built a 5 nm in height pyramidal cage called tetrahedron thanks to 53 nm side triangles. Using triangle too, Hamblin *et al.*<sup>141</sup> showed the creation of 3D DNA nanotubes. Benson *et al.*<sup>142</sup> self-assemble DNA mesh leading to more complex structures such as a rabbit(Figure 10.a).

Interestingly, 3D DNA structure can also be dynamic. When origami is organized to supramolecular structure through Bennett linkage, they are flexible<sup>143</sup>. Thanks to the freedom degree of liberty allowed by the Bennett linkage, these 3D structures are dynamic. In the same way, Marras *et al.*<sup>144</sup> showed a flexible 3D DNA structure crank slider thanks to simple stranded DNA (Figure 10.b). Recently, Wang et al.<sup>145</sup> achieved a dynamic origami structure allowing the formation of 2D semicircle but also cylinder structure in 3D.



**Figure 10:** DNA based 3D nanostructures. **a.** Mesh like structure of a Stanford bunny. Scale bars in the TEM image are 50 nm. Adapted from Reference<sup>142</sup>. **b.** (Top) DNA origami crank–slider incorporated three hinges and one slider joint. Thin lines represent single stranded DNA. (Bottom) TEM image of this 3D mobile structure. Scale bar is 100 nm. Adapted from Reference<sup>144</sup>.

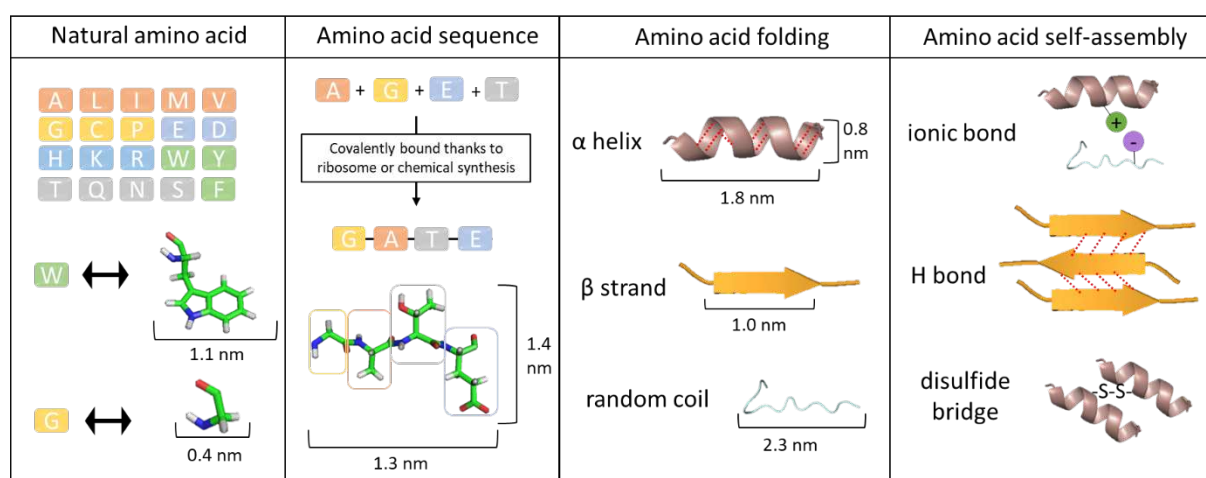
### 1.2.4. Conclusion

DNA can self-assemble in 2D or 3D intricate structures and they are easily tunable. Most of the time, it leads to discrete nanostructure (below 100 nm in width) with no limitation in the shape (smiley, letter, animals...). Noteworthy, DNA 2D arrays are achievable covering an area over the micrometer scale with pitch down to 10 nm. The specific recognition between the base pair is an enormous advantage to build and predict these structures even if the DNA alphabet is only composed of the four bases. Besides, in the above-reviewed publications pattern defects often occur when large array is reached, and discrete DNA nanostructure are sometimes not well-defined or in a little amount. Thus, a key point in

future progress on DNA nanostructure could be a more specifically driven self-assembly. Following this way, modified DNA base pairs are used to direct the self-assembly through light stimulation<sup>146</sup>.

### 1.3. Amino Acid as Building Blocks

Unlike DNA and its 4 different building blocks, peptide and protein are composed of 20 building blocks called amino acid with natural abilities to self-assemble. The combination between these 20 amino acids will generate various arrangements known as secondary structure including  $\alpha$  helix,  $\beta$  strand and random coil (Figure 11). Whether these structures are covalently bound or not, they can be associated by non-covalent bonds and even by covalent one with the formation of disulfide bridge. Although the structure prediction of peptide and protein is still challenging, their self-assembly abilities are growing in interest as amino acid present a wide diversity of chemical properties due to their side chain.



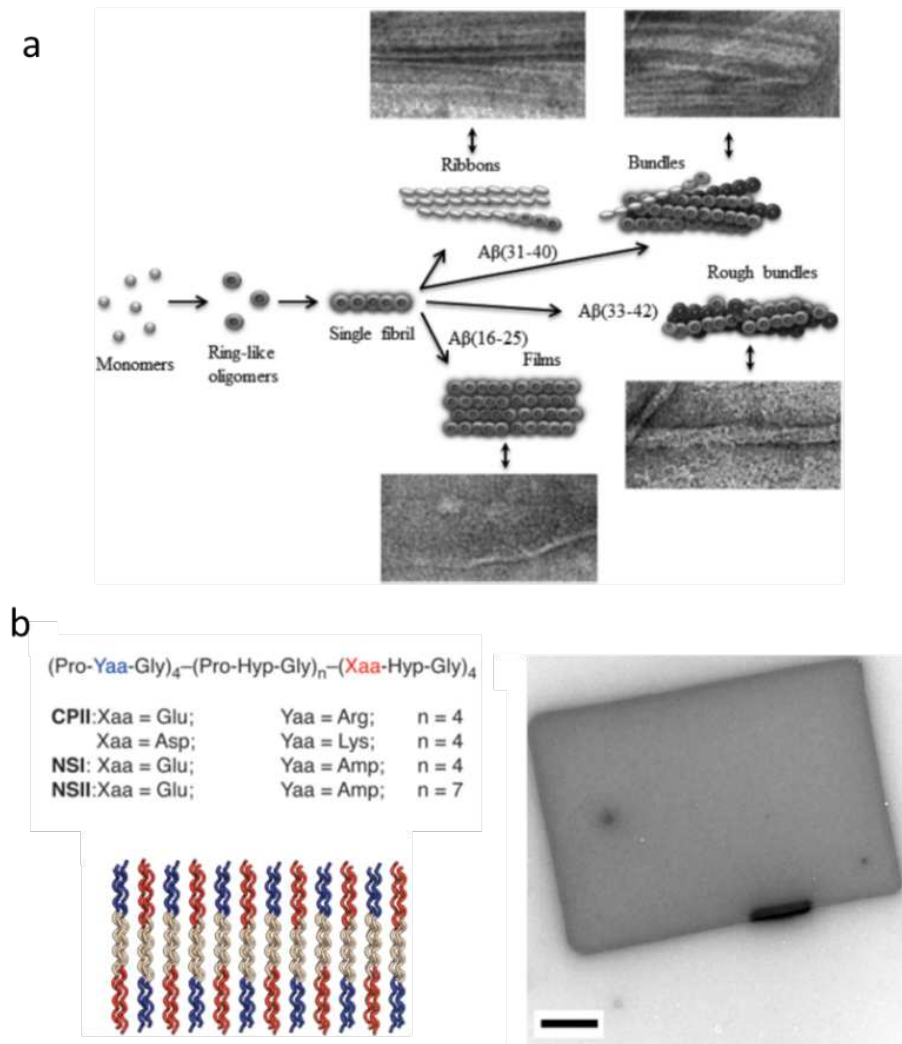
**Figure 11.** Amino acids are able to self-assemble in defining structures. Each letter corresponds to an amino acid owning specific chemical properties thanks to its side chain. Once they are covalently bound, secondary structure are formed. The amino acid self-assembly occurs thanks to different interactions between the secondary structure. The red dotted lines are corresponding to H bonds.

#### 1.3.1. Peptide based self-assemblies

Peptides are short sequence of two to fifty amino acid covalently linked. Peptide based nanomaterials for nanotechnological uses is a booming field especially in the biomedical one in which peptides are mainly used as drug nanocarriers<sup>147</sup>. The kind of self-assembly range from sphere (0D) to tubes (1D) to sheet and bilayers (respectively 2D and 3D)<sup>148</sup>. While the former are well developed, the latter remain on the fringe even if a large diversity of peptides can be used to perform self-assembly<sup>149</sup>.

### 1.3.1.1. Different Types of Peptides

Most of the studies dealing with peptide self-assemblies investigate the molecular mechanism of amyloid peptide,  $A\beta(1-42)$ , or small portion of it, as it is involved in neurodegenerative diseases including Alzheimer and Parkinson. Amyloid peptides are composed of a succession of several  $\beta$ -strands leading to the formation of a  $\beta$ -sheet fibril through hydrogen bonds. Each fibril is able to interact laterally with another one leading to a characteristic stripped structure<sup>150</sup>.

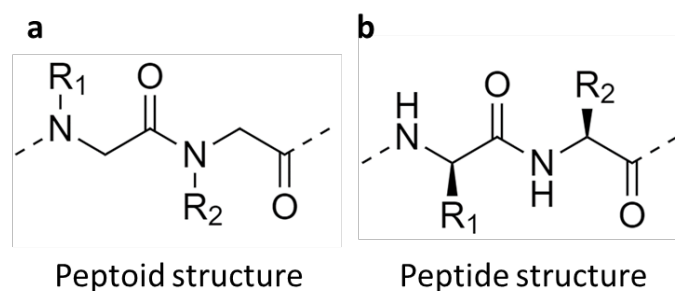


**Figure 12:** Example of peptides forming nanostructures. **a.** Schematic representation of the possible mechanism of fibril formation by fragments of  $A\beta$  peptide and TEM images associated. Adapted from Reference<sup>151</sup>. **b.** (Left) Amino acid sequence of the collagen-mimetic peptide and proposed packing of collagen triple helices within 2D layers through electrostatic interactions. (Right) TEM image of the 2D layer. Scale bar is 1  $\mu$ m. Adapted from Reference<sup>152</sup>.

Selivanova et al.<sup>151</sup> cut the  $A\beta(1-42)$  in three parts and show that each piece of this peptide forms 6-7 nm fibrils with a length of more than 1  $\mu$ m. Moreover, for the  $A\beta(16-25)$  peptide, a closer look at the fibril revealed a honeycomb-like structure with a ca. 6 nm pitch (Figure 12.a). Interestingly, Dai et al.<sup>153</sup> revealed a 2D nanosheet formation of  $A\beta$  KLVFFAK presenting a width of 200 nm. With the addition 0.5 M NaCl, the width increases by 10 fold. The formation of the amyloid fibril is attributed to the central motif phenylalanine-phenylalanine (FF). In fact, this dipeptide itself is able to form fibrils but can adopt a spherical morphology by the coordination of  $Hg^{2+}$ <sup>154</sup>.

Another class of peptide used for self-assembly is the Collagen-Mimetic Peptide (CMP). CMP are derived from the collagen tripeptide repeated sequence  $(\text{Gly-X-Y})_n$  with X and Y any amino acid residue but often Proline and Hydroxyproline<sup>155</sup>. CMP is composed of sequential tripeptides blocks presenting diverse characteristics due to the nature of the X and Y amino acid. In general, the first block is positively charged, the second is neutral and last one is negatively charged. The CMP are able to form the characteristic collagen triple helix that will lead to the formation of 2D nanosheets thanks to hydrophobic interactions (Figure 12.b). Merg et al.<sup>156</sup> showed a correlation between the number of tripeptide repetition in the second block and the length of the nanosheets. By decreasing the repeat from 7 to 4, the nanosheet length is increased from 150 nm to 1  $\mu\text{m}$ . Jiang et al.<sup>152</sup> also showed 2D nanosheets based on CMP and modified the sequence of their design CMP to get homogenous nanosheets of 600 nm in length<sup>157</sup>. All CMP based 2D nanosheets present pitch of ca. 1.1 nm.

One major issue for peptide self-assemblies is the tendency of peptides to create fibrils instead of 2D structures because of their ability to twist in space due to their natural chirality. Recently, Insua and Montenegro<sup>158</sup> design a cyclic peptide depicting an alternating chirality D-L in the amino acid sequence forcing its self-assembly into nanotubes then in 2D nanosheets of  $260 \times 50 \mu\text{m}^2$ . All this self-assembly process is mediated with H bonds. Unnatural structure called  $\Sigma$ -strand is also used to overcome the twist issue. This structure is found in peptoid (Figure 13.a) which are N-substituted glycine with side chain linked to the nitrogen instead of the  $\alpha$  carbon (Figure 13.b).

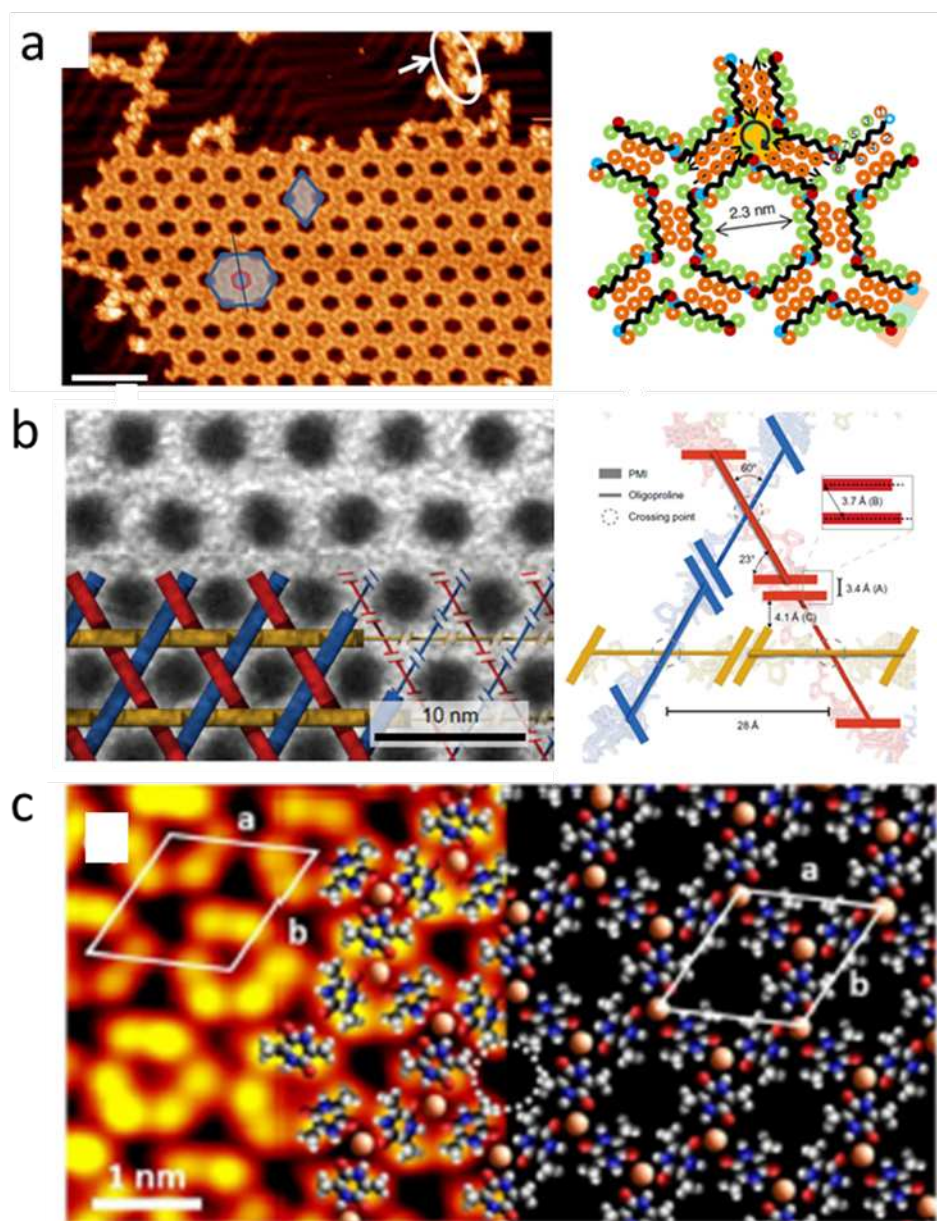


**Figure 13:** Architecture of peptoid (a) compared to the peptide one (b).

Thanks to that peptoid  $\Sigma$ -strand, nanosheet larger than 10  $\mu\text{m}$  are obtained with a fingerprint morphology<sup>159</sup>. Sanii et al.<sup>160</sup>, for their part, showed peptoid nanosheet reaching the millimeter scale. One of the key to get large 2D array of peptoid is the length of the peptoid itself. Mannige et al.<sup>161</sup> showed, by simulation and by *in vivo* experiments, that short peptoid (fewer than 12 amino acid) are unable to form stable nanosheets.

### 1.3.1.2. Driving Peptide Self-Assembly

The modulation in peptide self-assembly can be achieved through different ways. First, it has been shown that the sequence order of the amino acid is crucial for peptide self-assembly. Erdogan et al.<sup>162</sup> studied the self-assembly of the dipeptide Val-Ala and Ala-Val. The first one is able to form dense and compact square structure whereas the second one will only form wire. For their part, Bera et al.<sup>163</sup> compare the self-assembly of A $\beta$ (16-22) and the reverse peptide A $\beta$ (22-16) and show that the reverse peptide does not form fibrils. Interestingly, Abb et al.<sup>164</sup> constructed a 2D honeycomb structure with a 5.5 nm pitch by cleaving 2 amino acids from angiotensin I thus creating H bonds between the peptide (Figure 14.a).



**Figure 14:** Peptide based 2D nanostructures. **a.** Scanning tunneling microscopy image of honeycomb structure of Angiotensin II. Scale bar is 15 nm. Adapted from Reference<sup>164</sup>. **b.** (Left) TEM image (Right) Schematic illustration and zoom of a Kagome weave of oligoproline-PMI. Adapted from Reference<sup>165</sup>. **c.** Porous network of cyclic dipeptide L-Ala-L-Ala mediated through  $\text{Cu}^{2+}$  coordination. Adapted from Reference<sup>166</sup>.

Secondly, self-assembly can be driven by the supply of chemical molecules. Lewandoska et al.<sup>165</sup> self-assembled oligoproline with perylene-monoimides in a “mesh-like structure” presenting a 5.5 nm pitch (Figure 14.b) thanks to  $\pi$ - $\pi$  stacking. 4,4'-bipyridyl (4Bpy) was used to allow the formation of A $\beta$ (33-42) amyloid film rather than fibril<sup>167,168</sup>. Moreover, a combination between 4Bpy and highly oriented pyrolytic graphite showed poly-glycine self-assembly leading to a striped pattern<sup>169</sup>. In another way, Li et al.<sup>170</sup> achieved the modulation of A $\beta$ (33-42) thanks to graphene oxide (GO) from fibrils at a GO concentration below  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  to 2D film at a GO concentration above  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Recently, Guo et al.<sup>166</sup> studied the  $\text{Cu}^{2+}$  mediated self-assembly of the cyclic peptide L-Ala-L-Ala in 2D honeycomb-like structure with a 1.35 nm pitch (Figure 14.c).

The nature of the solvent in which the peptides are dissolved may also play a role in the modulation of the self-assembly. For example, the Val-Ala dipeptide is forming large square in pyridine but wires in 2-propanol<sup>162</sup> as alcohol will disturb the H-bonding between the dipeptides. Noteworthy, Pan et al.<sup>171</sup> showed that free electron in water allow the formation of A $\beta$ (16-22) film with 10 x 10  $\mu\text{m}^2$  dimensions. Interestingly, the modulation in the electric field or in the magnetic field leads to a change in the aggregation of FF in solution<sup>172</sup>.

### 1.3.1.3. Conclusion

The centimeter scale is easily obtained in the 2D self-assemblies created thanks to peptide building blocks<sup>173</sup>. In addition, the pitch pattern is in general below the nanometer scale as it refers to the distance between two stacked peptides. Even so, the shapes of the lattice are poorly tunable and works on nanopatterning surface thanks to peptides self-assembly is in a minority.

## 1.3.2. Protein Self-Assemblies

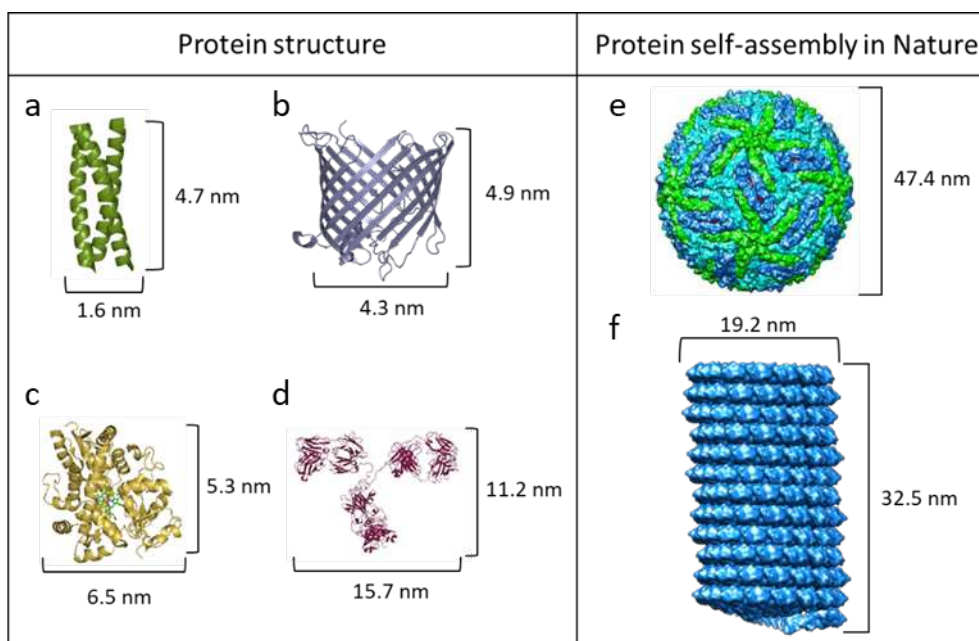
Protein are long polypeptides folded thanks to hydrophobic, ionic, hydrogen bond and disulfide bridge leading to tertiary structure. Some protein has also the natural abilities to interact with themselves or other protein partners to get self-assembled structures (Figure 15). We can have access to all the known protein structures in the Protein Data Base (PDB). As DNA, the protein structures have been twisted from their initial purpose. Building 2D arrays with these materials have gained in interest in the last years as they are promising biomaterials for nanotechnological applications<sup>174,175</sup>.

Pioneer works on protein self-assembly is based on the reassembly of bacterial protein called T and S-layer<sup>176,177</sup>. In these works, bacterial peptidoglycan is extracted from bacteria and then reassemble, through cation coordination, into 2D arrays with a 13 nm pitch. Depending on the cations used ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  or  $\text{Na}^+$ ), cylinders ( $\Phi$  1  $\mu\text{m}$ ) and sheets (area of 10  $\mu\text{m}^2$ ) structures are obtained<sup>178</sup>. If the concentration of the cation is above 50 mM, the cylinders obtained is smaller ( $\Phi$  130 nm) or not well-defined structures appeared<sup>178</sup>. Later Györvary et al.<sup>179</sup> showed a well-arranged S-layer bilayer covering an area up to 2 x 10  $\mu\text{m}^2$  in diameter through  $\text{Ca}^{2+}$  coordination. Nowadays, S-layer are still studied as a biomaterial<sup>180</sup>. Up to date, protein self-assemblies works onto surfaces are mainly based on bio engineering of known protein taken from the PDB. Indeed, amino acid residues have specific chemical properties thanks to their side chain which can be used to drive the self-assembly.

### 1.3.2.1. Self-Assembly Through Covalent Bonds

Protein self-assemblies can be driven by covalent bonds between the side chain of the residues. Zhao et al.<sup>181</sup> produced the specificity protein 1 (SP1) with a tyrosine mutation. The use of horseradish peroxidase allows covalent bonds between two nearby SP1 monomers via tyrosine leading to ring shape nanosheets domains of 200 x 200 nm with a 11 nm pitch.

More commonly, covalent bonds between proteins are disulfide bridge. By mutated one amino acid into a cysteine in the human H ferritin, Zhou et al.<sup>182</sup> showed, in oxidative environment, a self-assembly leading to protein nanocages 2D arrays with a 11.4 nm pitch. Using the same approach, Nguyen et al.<sup>183</sup> obtained ribulose -1, 5- biphosphate carboxylase oxygenase (RubisCo) nanotubes on a length maximum 400 nm. Thus, by modifying the cysteine mutation position on the L-rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhuA) monomer surface, Du et al.<sup>184</sup> showed square open or closed arrays with constant pitch of 11 nm (Figure 16.a).



**Figure 15.** Proteins naturally adopt a wide range of structures (a-d) thanks to amino acid self-assembly. They are also able to self-assemble in supramolecular structure (e-f). **a.** Trimeric coiled coil of a leucine zipper (PDB: 2O7H). **b.** TamA  $\beta$ -barrel domain (PDB: 4N74). **c.** Human cytochrome P450 (PDB: 1W0E). **d.** Mouse immunoglobulin (PDB: 1IGT). **e.** Capsid of Zika virus (PDB: 5IRE). **f.** Capsid of tobacco mosaic virus (PDB: 4UDV).

### 1.3.2.2. Self-Assembly Through Metal Coordination

In nature, some proteins are known to interact with metal<sup>185</sup>. This ability has been twist to create 2D array of protein. Matthaei et al.<sup>186</sup> used  $\text{Ca}^{2+}$  with a modified STM4215 protein to get a honeycomb-like structure of 7 nm pitch with a length characteristic from 1 to 10  $\mu\text{m}$ . Most of the works in protein self-assemblies driven by metal coordination use the ability of histidine residue to coordinate divalent cations. Heyman et al.<sup>187</sup> showed an array of SP1 protein thanks to  $\text{Cd}^{2+}$  coordination with histidine tag in a 7 nm pitch honeycomb. In the same way, Zhang et al.<sup>188</sup> also use  $\text{Ni}^{2+}$  to induce nanowire formation of glutathione S-transferase (GST) fused with a histidine tag. Interestingly, Brodin et al.<sup>189</sup> showed a modulation in the shape of the RIDC3, an engineered variant of cytochrome  $\text{cb}_{562}$ , self-assemblies from 2D arrays to 1D nanotubes when the  $[\text{Zn}^{2+}]$  is 3 fold more the  $[\text{RIDC3}]$ . In a more complex way, Yang and Song<sup>190</sup> used coordination between  $\text{Ni}^{2+}$  and bipyridine-alanine functionalized acetyltransferase forming rods with a length of maximum 900 nm.

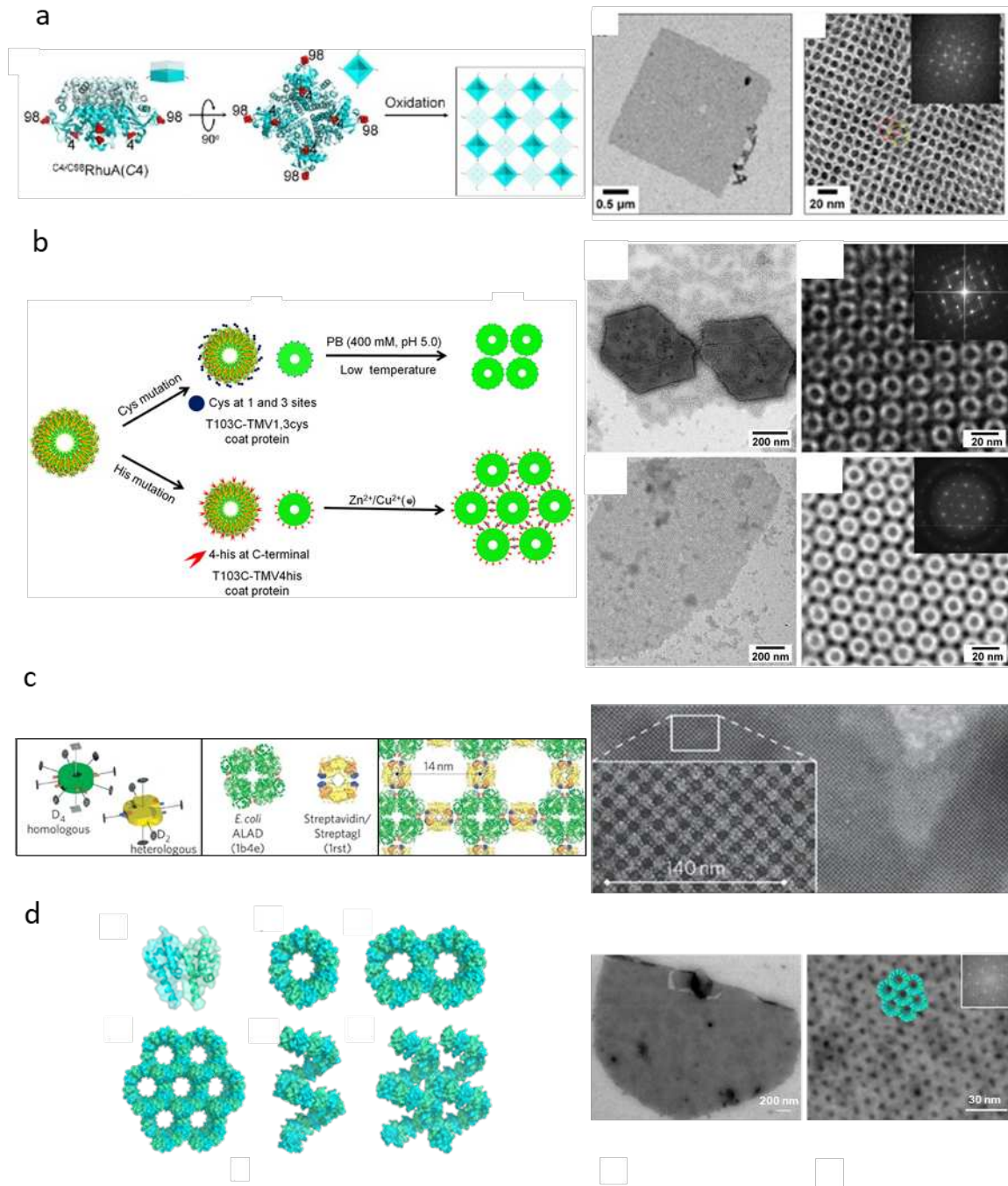
Remarkably, taking advantage of metal coordination and disulfide bond together, the rectangular shape of the tobacco mosaic virus self-assembly can be tuned in a honeycomb structure with a pitch of 20 nm<sup>191</sup> (Figure 16.b). The same method was used by Suzuki et al.<sup>192</sup> with RhuA protein leading to a reduction of the porosity between the protein by 1.5 but keeping the 10 nm pitch.

### 1.3.2.3. Self-Assembly Through Monovalent Bounds

For many biological events, the recognition between a ligand and a receptor is important to activate or inactivate pathways<sup>193</sup>. Ligand-receptor interactions are strong and specific ones. It became a strategy used to create but also to modulate the self-assembly. Yang et al.<sup>194</sup> showed a 100 x 100 nm 2D arrays with a 5 nm pitch of Rhodamine B, a lectin, through sugar recognition. By the use of different sugars, structures form 1D to 3D are obtained. In the same way, Sakai et al.<sup>195</sup> used concavalline A and modified D-manose to form a 2D sheet of 100  $\mu\text{m}^2$  with a pitch of 8 nm. In some cases, the ligand and

receptors are fused with two different proteins and allow self-assembly<sup>196</sup>. For instance, Sinclair et al.<sup>197</sup> designed 1D chains and 2D lattices with proteins fused with the couple Streptag I/Streptavidin allowing regular crystalline assembly depicting a pitch of 14 nm (Figure 16.c). Recently, the modulation of the length of the linker for host-guest interaction in a cystein mutant GST self-assembly showed a variation in the shape from ring to nanowire<sup>198</sup>.

Otherwise, hydrophobic interaction naturally found in membrane protein is used to create fibrils or polygonal meshes<sup>199</sup>. It's possible to insert hydrophobic interaction in ferritin through ameloidogenic motifs to create 2D and 3D cuboid pattern<sup>200</sup>. The addition of poly ( $\alpha$ D-lysine) on ferritin leads to electrostatic interaction between lysine residues and to a 12.6 nm pitch 2D square array<sup>201</sup>. Ferritin has also been modified with aromatic amino acid residue leading to  $\pi$ - $\pi$  interaction and 2D or 3D lattices formation having a pitch of 11.4 nm<sup>202</sup>. Interestingly, oligomeric domain of LEAFY, a transcription factor in plants, can self-assemble naturally in a 8 nm pitch honeycomb structure covering an area of almost 5  $\mu\text{m}^2$ <sup>203</sup> (Figure 16.d).



**Figure 16:** Protein based 2D lattices. Schematic illustration (Left) and TEM images (Right) of the nanostructures. **a.** RhuA network mediated through disulfide bound. Adapted from Reference<sup>145</sup>. **b.** Tobacco mosaic virus coat protein self-assembly. Adapted from Reference<sup>191</sup>. **c.** ALAD plus streptavidin/Streptag I lattice. Adapted from Reference<sup>197</sup>. **d.** GbLFY-SAM honeycomb structure. Adapted from Reference<sup>203</sup>.

#### 1.3.2.4. Conclusion

In protein self-assembly, a wide diversity of nanostructures is achieved. Remarkably, shapes of the self-assemblies can be easily tuned thanks to pH, salt concentration<sup>19</sup> and can be resistive to solvents such as DMSO<sup>196</sup>. Most of the time, protein pitch pattern size is below 10 nm with covered area around 200 nm<sup>2</sup>. Unlike DNA, protein hasn't intrinsic programmable recognition based on amino acid residues. In the last years, works have been made to create *de novo* self-assembly<sup>204–206</sup> and also to predict interaction between the self-assembly and the surface<sup>207</sup>. Noteworthy, most of these self-assemblies are

2D monolayers. For the ones that have several layers, this is a stacking of monolayers through divalent cation addition<sup>208</sup> or hydrophobic interaction<sup>182,192,200</sup>.

## 2. Self-Assemblies for Nanopatterning in Nanotechnological Applications

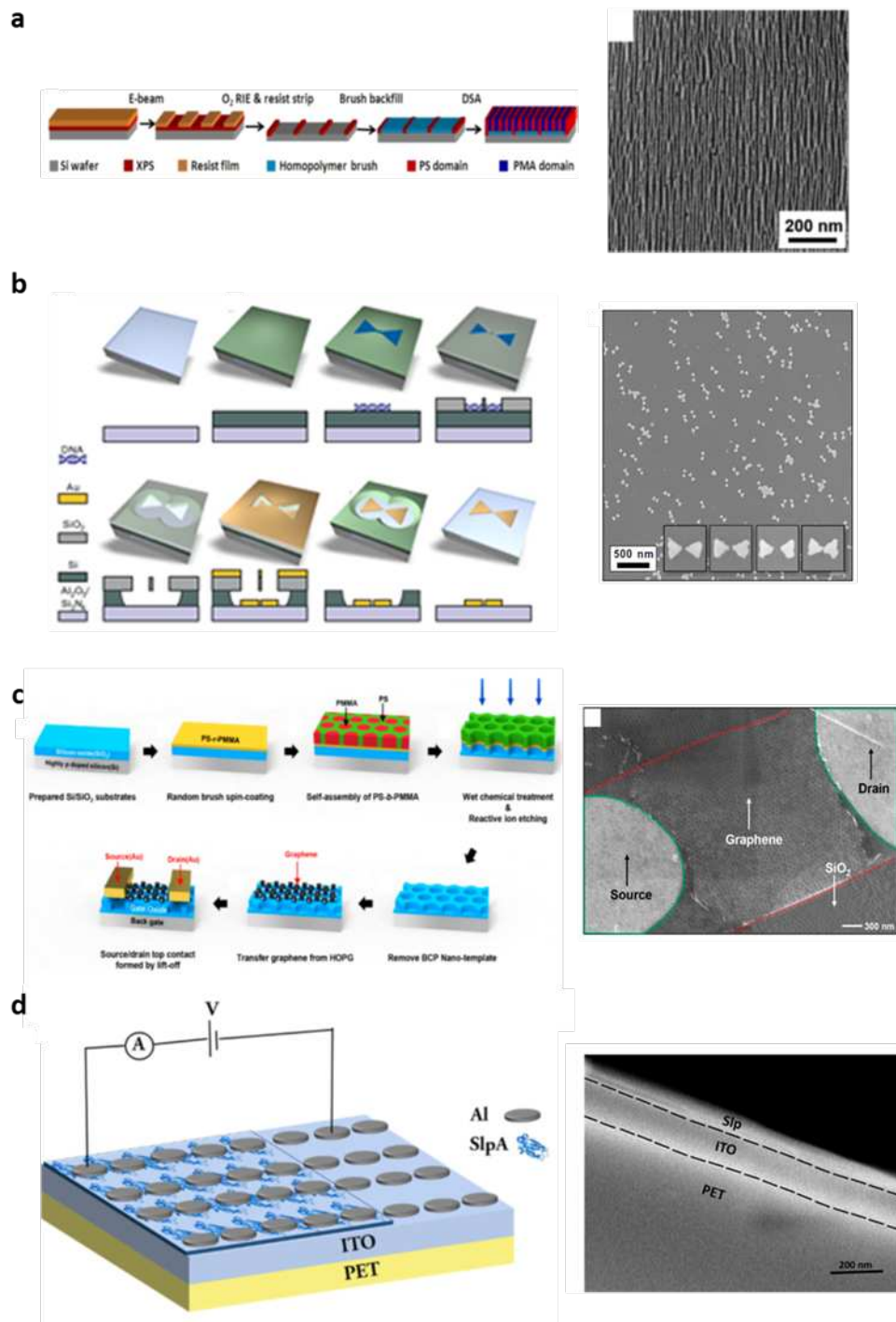
The evolution of nanotechnologies but especially their democratization in our everyday life gives rise to an increasing demand in terms of engineering to meet the needs of the modern world. From connected cars to television but also to washing machines and doors, a high number of daily-life devices are now connected altogether or with the cloud. This phenomenon is called the Internet of Everything (IoE). Often increasing the life quality of people, this phenomenon can play an environmental role with for example the reduction of the city lighting depending on natural sun light or in the agricultural domain in which farmers can use to put the right amount of fertilizer in their field. Although, one connected device is not consuming many resources, the skyrocket number of them lead, for example, to a constantly increasing energy consumption. With the climate change issue, it is now urgent to improve these devices to reduce their environmental impact. Modern society's demands also concern health and environmental monitoring. Following the adage, "an ounce of prevention is worth a pound of cure", emphasis was placed on early detection of molecules, whether they are dangerous or not. It implies a research strategy focused on the sensitivity of the molecule detection.

In that context, nanopatterning with self-assemblies find its usefulness. On the one hand, having densely packed nanostructures reduces energy losses. On the other hand, the enhancement of the surface specificity thanks to precise nano organization of the matter allows a multiplication of grafting site possibilities which may have an impact on light absorption, energy conservation or on analyte detection.

### 2.4. Electronics

Since the 21<sup>st</sup> century, the demand for electronic devices has steadily increased. With the IoE, the trend is towards miniaturization of the devices. It entails a more substantial juxtaposition of electronics components on the classical silicon chip commonly found in the computer, TV, smartphone, etc. This densification of the chip involves a reduction of the pitch size (the distance between two neighbors electronic components). For the reasons mentioned in the Introduction section, self-assembled networks offer a promising alternative to the conventional lithographic technics. These current technics require multiple chemical processes, such as resists fabrication, mask alignment and so on. The main use of the 2D lattices in electronics is the replacement of the resist in the process to allow engraving of the surface. For example, BCP have been extensively studied for the substitution and so the improvement of masks for etching process<sup>209</sup>. As an example, Pang et al.<sup>210</sup> used poly(styrene-*b*-methyl methacrylate) (PS-*b*-PMA) and also poly-(methyl acrylate-*b*-styrene-*b*-methyl acrylate) (PMA-*b*-PS-*b*-PMA) to engrave aluminum oxide with features down to 7 nm (Figure 17.a). Self-assembly based on DNA are also used as a mask for nanolithography process. Diagne et al.<sup>211</sup> constructed a cuboid DNA origami with a hole of 9 x 14 nm<sup>2</sup> at the center and deposited it on SiO<sub>2</sub>. After etching, the shape of the origami is printed on the surface. Similarly, Shen et al.<sup>212</sup> showed engraving of a bowtie and a cross origami on silicon nitride (Figure 17.b). In another way, Tian et al.<sup>213</sup> also used DNA nanostructure to create a polymer mold in which the DNA shape is replicated. Then, this polymer mold is used, multiple times, to print the shape in other substrate. Interestingly, Piskunen et al.<sup>214</sup> presented a biotemplated lithography of inorganic nanostructure using either DNA origami or Tobacco Mosaic Virus structures engraving the substrate to further metalized the structure. Proteins are also used as resist by spin coating on the surface and photolithography is used to create shapes as square or stars with dimensions ranging from 5 to 100 μm<sup>215</sup>. Han et al.<sup>216</sup> developed a bionanosphere lithography process based on peptide triphenylalanine sphere self-assembly leading to hexagonal and dense structure.

Beyond nanolithographic masks, self-assemblies found usefulness in field-effect transistor (FET). FET often served as an amplification signal in integrated circuits. In this transistor, electric current occur between two electrodes, the source and the drain, when a voltage is applied to the control electrode, the gate. For example, PS-b-PMMA was used to engrave silicon substrate subsequently allowing the deposition of graphene between the source and the drain <sup>217</sup> (Figure 17.c). Gate dielectric field-effect transistor was also obtained thanks to the self-assembly of FF (phenylalanine-phenylalanine) <sup>218</sup>.



**Figure 17:** Self-assembled lattices for electronics applications. Schematic illustration of the process (Left) and SEM images (Right) of the nanopatterned structure. **a.** Creation of  $\text{AlO}_x$  nanostructures thanks to the BCP  $\text{PMA-b-PS-b-PMA}$ . Adapted from Reference<sup>210</sup>. **b.** Fabrication of origami patterns thanks to DNA-assisted lithography method. Adapted from Reference<sup>212</sup>. **c.** Suspension of graphene on silicon substrate patterned thanks to the BCP  $\text{PS-b-PMMA}$ . Adapted from Reference<sup>217</sup>. **d.** Flexible memory device fabrication with S-layer self-assembly. Adapted from Reference<sup>219</sup>.

In almost all the electronic devices, metal-semiconductor are used for their isolative and conductive properties. DNA origami served as a template for metal-semiconductor junctions of gold and tellurium depicting electron conductivity<sup>220</sup>. Interestingly, Moudgil et al.<sup>219</sup> studied the resistivity of self-assembled S-layer protein to create non volatile memory devices defined as memory storage that does

not need electricity, *e.g.* USB keys. The constructed device can retain the information for more than  $4 \times 10^3$  s and is stable over time (Figure 17.d).

Overall, the use of self-assembled building blocks in electronics requires a not easy paradigm shift in the mainstream process<sup>221</sup>. One of the drawbacks to use self-assembled building blocks is that a single type of nanopattern is present on the surface, whereas nanopattern for electronics often requires a combination of shapes on the surface. The next step for this field of research could be a mixture of several self-assembled nanostructure, *e.g.* BCP and protein, on the same surface. Moreover, there is a need for high volume manufacturing which is, to date, not achievable compared to classic process used.

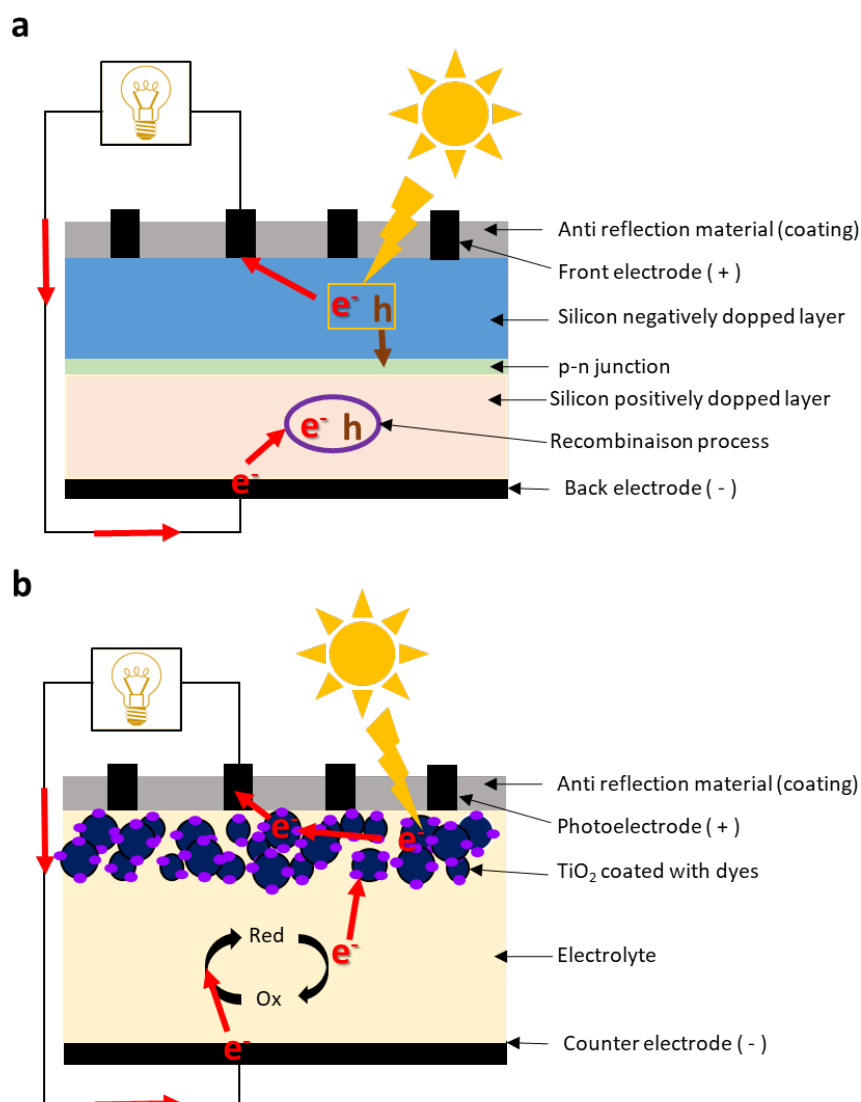
## 2.5. Energy Production and Storage

Globally, the development of self-assembled molecules in the energy field is skyrocketing. All the self-assembled molecules presented in the section 1 of this review are cheap but also present mechanical properties including the resistivity to heat or to shearing, the ability to regain their original structure after deformation and sometimes natural abilities to conduct electrons. A first good example is DNA. When DNA is in the helix form (double stranded DNA, dsDNA) it can resist to heat up to 230 °C when it is put on a surface. Moreover, thanks to the nucleobase, it has natural abilities to charge transfer<sup>222</sup>. A second interesting example is the proteins involved in the plant photosystem called PSI. This natural protein photosystem was coupled onto a gold electrode showing electron conduction even if the protein were dried<sup>223,224</sup>. It turns out that the use of self-assembled nanostructure in the energy field either in photovoltaic or in battery, allows a precise division of the surface which presents a huge advantage for the mobility of electrons. Thus, the so-formed devices depict an enhancement in their capacity of production or energy storage. In the following section, the role of 2D lattices in photovoltaic devices and in energy storage devices will be highlighted.

### 2.5.1. Photovoltaic Devices

In the context of climate change, focus is put on renewable energy including photovoltaic. Classic solar cell devices are composed of an anti-reflective coating, a front electrode, a negative layer of silicon, a positive layer of silicon and a back electrode (Figure 18.a). In the silicon solar cell, the sunlight allows the extraction of electrons from the negative layer leaving an empty hole. The electron will be recombined with a hole from the positive layer after going through the electric circuit. The p-n junction forces the electron to go through the external circuit.

Another type of solar cell also studied are dye sensitized cells (DSSC) (Figure 18.b). That kind of cell is composed of two electrodes between which there are a mesoporous TiO<sub>2</sub> structure with dyes and an electrolyte. The light excites the dyes that transfer the electron to the TiO<sub>2</sub> then to the external circuit. The electrons are reintroduced in the cell thanks to the counter electrode, given to the electrolyte enabling the regeneration of the dyes. Moreover, there are other solar cells using perovskite as active layer (perovskite solar cell) or organic polymer to conduct electrons (organic photovoltaic cell).



**Figure 18.** Schema of the principle of (a) silicon and (b) dye sensitized solar cells.

Whatever the type of the solar cell, its performance is mainly driven by i) the ability of the material to absorb photons emitted from the sun, ii) the efficiency of the solar cell to transport charges from the anode to the cathode.

#### 2.5.1.1. Coating

Absorption of the solar light by the solar cell is facilitated with the coating part allowing an improvement of the device by diminishing the reflection effect. The optical properties of the cellulose was used by Ha et al.<sup>225</sup> to develop an anti-reflection coating for photovoltaic cells. The use of cellulose allows the diminution of the reflection phenomenon from 35-45% to 15-25% leading to an enhancement of the solar cells performances by 23.8%. In another way, Adak et al.<sup>226</sup> used a commercial triblock copolymer called Pluronic® to create mesoporous TiO<sub>2</sub> structure to get both transparent and superhydrophobic coating for self-cleaning surfaces.

### 2.5.1.2. Electrolyte

The use of biosourced materials in the photovoltaic field allows, on the one hand to get less noxious devices but also simplify the construction of the cells. For example, Poskela et al.<sup>227</sup> built a DSSC with a quasi solid-state electrolyte based on cellulose and chitin showing an efficiency enhancement of 44% compared to classic cells (Figure 19.a). However, these cells degrade rapidly. One major drawback of the dye-sensitized cell is the liquid electrolyte often leading to leaks, poorly stable over time and acting as corrosive for the anode and the cathode. To overcome this issue, solid polymer electrolyte has been developed but they depict weak ionic conductivity. Although, cellulose does not depict electron conductivity alone<sup>228</sup>, its mesoporous structure is suitable for ionic conduction. CNC coupled with poly(oligoethylene glycol methacrylate) was used by Or et al.<sup>229</sup> to produce a quasi-solid electrolyte thereby increasing the ionic conductivity and resulting in a power conversion efficiency (PCE) of the cell of 4.98%. This time using BCP, Chen et al.<sup>230</sup> showed an improvement of the power conversion efficiency by 30%, poly(2,5-dihexyloxy-p-phenylene)-b-poly(3-hexylthiophene) (PPT-b-P3HT), rather than the P3HT. Indeed, PPT-b-P3HT increases the time residence of the electron allowing a decrease in the number of recombination process.

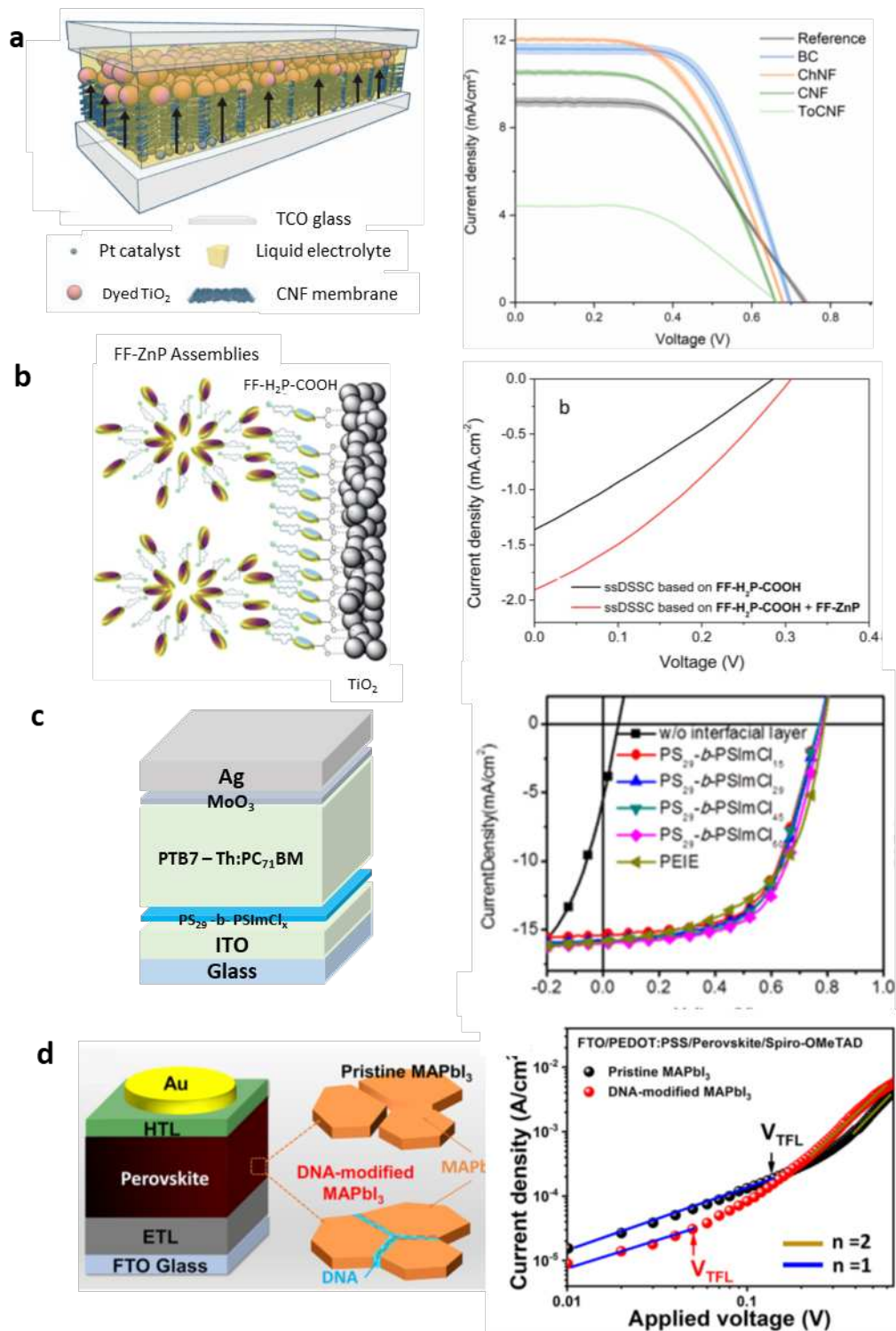
### 2.5.1.3. Electron Transfer

In DSSC, structure of the TiO<sub>2</sub> is also important for the electron transfer. Crossland et al.<sup>72</sup> used a BCP, poly(4-fluorostyrene)-b-poly(D,Llactide), as sacrificial mask to get a porous TiO<sub>2</sub> structure thereby improving the charge transport. DNA was also used to improve the electron transfer by acting as a bridge between the dyes and the TiO<sub>2</sub><sup>231</sup>. Diphenylalanine peptide self-assembly has also been used as a scaffold to ZnP and porphyrins leading to the creation of DSSC with modulated power energy conversion depending on the antenna effect<sup>232</sup> (Figure 19.b). In organic photovoltaic cells, electron acceptors and electron donors are mixed together to create microdomain where charge recombination can occur. With time, the acceptors and the donors will be separated. The geometry in that type of device is crucial. Indeed, if the acceptor domain and the donor domain are separated with a lamellar orientation, the surface contact between the two materials is maximal leading to more stable electron transfer over time. For this reason, BCP is a good material allowing global enhancement of the PCE of the cell<sup>233,234</sup>. Shi et al.<sup>235</sup> for their part, used fully conjugated BCP, P3HT-b-PFTBT, as unique active layer to do charge transfer in the cell. BCP are also used as interfacial layer (*i.e.* layer between the electrode and the active layer). To this end, Park et al.<sup>236</sup> used poly(styrene)-b-poly(1-(4-vinylbenzyl)-3-methylimidazolium chloride) and got a PCE of 7.55% higher than the organic polymer commonly used for interfacial layer (Figure 19.c). Interestingly, in perovskite cells, DNA is used as dopant in mesoporous TiO<sub>2</sub> to enhance the conduction properties of the cell<sup>237</sup>. Indeed, DNA has the ability to transport electrons on a long-range due the nucleobases leading to a decrease of the recombination phenomenon but also to a more stable device<sup>238</sup> (Figure 19.d).

Self-assemblies are widely used in all types of solar cells. In table 1, we provide a summary of the described structures and their principles characteristics.

Type of building blocks	Type of solar cell	Device component	Power conversion efficiency (%)	Reference
<b>BCP</b>				
P3HT-b-PFTBT	OPV	Heterojunction	0.023-0.025	233
PFS-b-PLA	DSSC	Template for TiO <sub>2</sub> mesoporous	1.1 - 3	72
PPT-b-P3HT	ssDSSC	Hole Transport Material	4.65	230
P3HT-b-PFTBT	OSC	Active layer	1.22	235
PS-b-PSImCl	OPV	Interfacial layer	7.55	236
<b>Cellulose</b>				
CNC + POEGMA	DSSC	Quasi solid electrolyte	4.98 %	229
<b>DNA</b>				
dsDNA	Perovskite	Electron transporting layer	17.59	237
dsDNA	Perovskite	Electron transporting layer	20.63	238
dsDNA	DSSC	Surface modifier layer	9.23	231
<b>Peptide</b>				
FF + ZnP + porphyrine	DSSC	Active layer	0.19	232

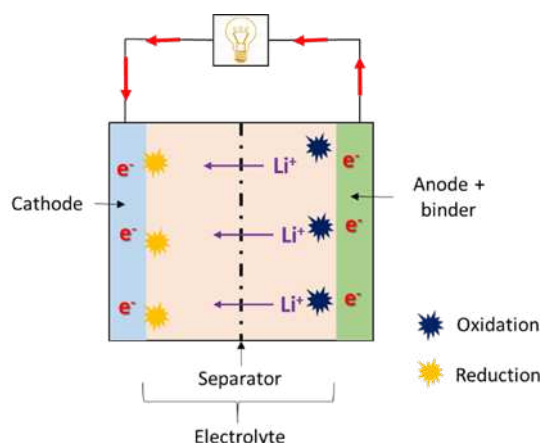
**Table 1.** Summary of the self-assemble molecules used in photovoltaic applications.



**Figure 19:** Self-assembled building blocks for photovoltaics. Schematic illustration (Left) and I-V curve (Right) of the devices. **a.** DSSC based on chitin nanofibers. Adapted from Reference<sup>227</sup>. **b.** Diphenylalanine self-assembly for ssDSSC. Adapted from Reference<sup>232</sup>. **c.** OPV devices based on the BCP PS<sub>29</sub>-b-PSImCl<sub>x</sub>. Adapted from Reference<sup>236</sup>. **d.** Enhancement of perovskite cell based on DNA. Adapted from Reference<sup>238</sup>.

### 2.5.2. Energy Storage Devices

Batteries are basic component for everyday life electronic devices. Battery is composed of an anode, a cathode, an electrolyte (*i.e.* an organic solvent in which is dissolved the ion) and a separator. The working principle of a battery is based on oxidoreduction reaction. At the anode, the oxidation of carbonic lithium, often lithiated graphite, leads to an electron flow through an external circuit. The electrons pass then at the cathode side to make the reduction reaction of the metal oxide lithium material (Figure 20). The electrolyte, characterized by its ionic conductivity, is a medium in which the ions are transported between the cathode and the anode. A material is considered as a good electrolyte if its ionic conductivity is in between  $10^{-5}$  and  $10^{-2}$  S.cm<sup>-1</sup>. The separators, for their part, are isolated layers between the anode and the cathode preventing form short circuit but allowing the conduction of the ions.



**Figure 20.** Schema of the principle of a lithium ion battery in discharge mode.

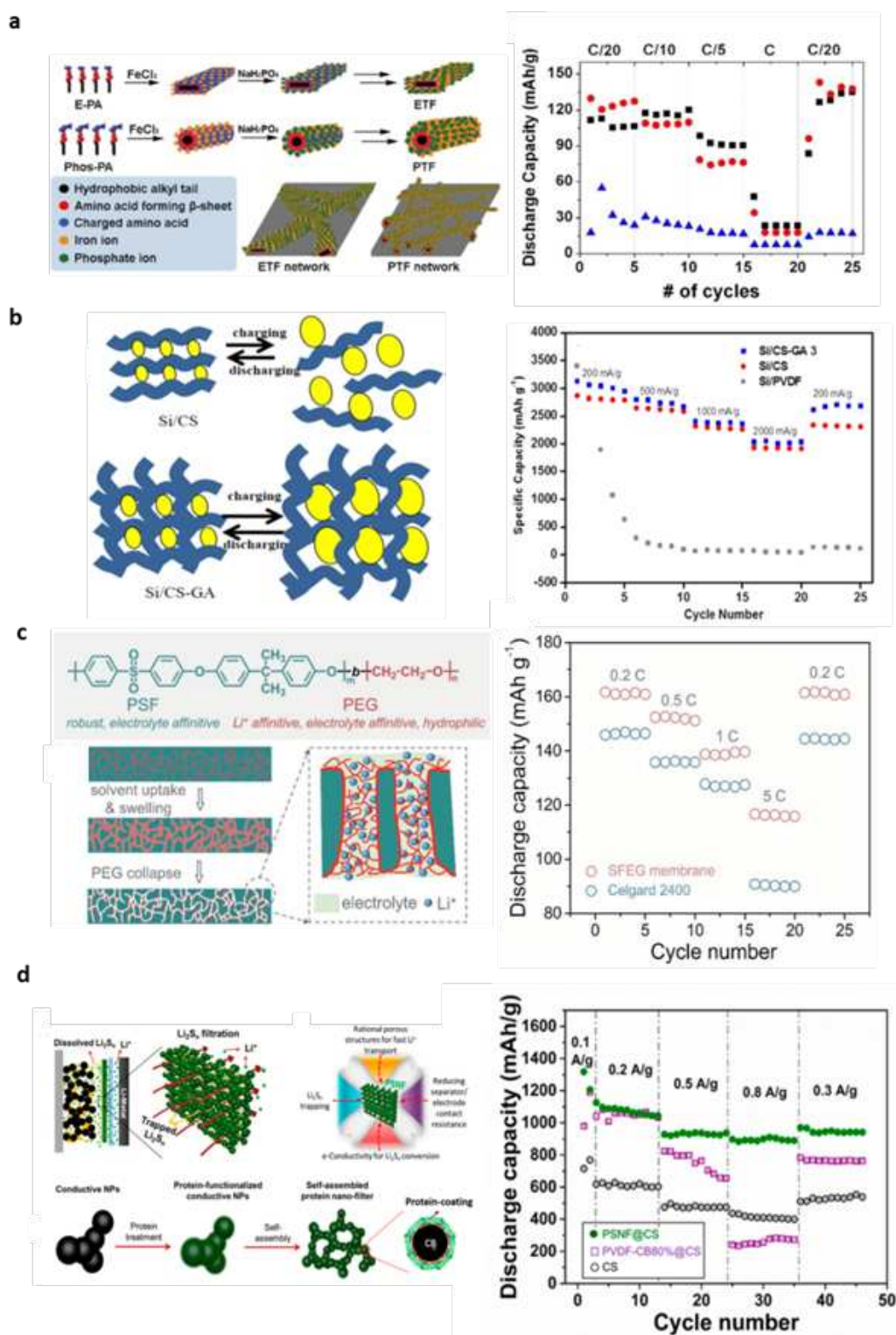
The most widely used type of battery is lithium-ion batteries (LIB). They are based on the movement of lithium ion between the anode and the cathode through charge/discharge cycle. Although these batteries are very efficient from an energy point of view, the lithium ions are very reactive which can lead to a premature degradation of the battery, for example, by increasing the temperature inside the device. Moreover, they remain quite expensive. For these reasons, self-assembled nanostructures are studied to replace, fully or partially, the common materials used in LIB. The following described self-assembled materials, their use in battery field as well as principle characteristics are summed up in table 2. In a general way, commercial LIB as a lifetime between 300 and 500 cycles. Discharge capacities for their part are variable depending on the type of materials used at the anode and at the cathode<sup>239,240</sup>.

Type of building blocks	Device component	Ionic conductivity (S cm <sup>-1</sup> )	Discharge capacity (mA h. g <sup>-1</sup> )	Reference
<b>BCP</b>				
PVDF-b-PTFE	Si anode	ND	1395	241
fluorinated multi-block copoly(arylene ether sulfone)s bearing lithium perfluorosulfonimide	Electrolyte	10 <sup>-3</sup>	150	242
PSF-b-PEG	Separator	10.1 x 10 <sup>-3</sup>	161	243
PEG + HDIt (PH-BCPE).	Electrolyte	5.7 x 10 <sup>-4</sup>	162	244
<b>Chitin</b>				
Nanofiber + Polyacrylamide	Electrolyte	9.3 to 15.2 x 10 <sup>-3</sup>	337.4	245
Nanofibers + sodium dihydrogen citrate	Separator	0.064 x 10 <sup>-3</sup>	157	246
Chitosan	Binder	ND	3023	247
Chitosan	Binder	ND	587.6	248
<b>Cellulose</b>				
Nanocrystal	Electrode	ND	125	249
Carboxymethylcellulose + 1-butyl-3-methylimidazolium chloride, [Bmim]Cl	Electrolyte	4.54 x 10 <sup>-3</sup>	2	250
Nanofiber pyrolysed	Sulfur cathode matrix	ND	805	251
<b>DNA</b>				
dsDNA + NiO	Anode	ND	840	252
dsDNA + FePO <sub>4</sub> + CNT	Cathode	ND	174	253
dsDNA + CNT	Cathode	ND	347	254
<b>Peptide</b>				
FF + FePO <sub>4</sub>	Cathode	ND	170	255
Lauryl-VVAGEK(phosphonoacetyl)-Am + FePO <sub>4</sub> + CNT	Cathode	ND	155	256
FF + Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Cathode	ND	80	257
<b>Protein</b>				
TMV	Cathode	ND	10 <sup>5</sup>	258

**Table 2.** Self-assembled building blocks for battery applications. \*ND: Not Described.

### 2.5.2.1. Anode and Cathode Materials

First, anodes and cathode can be improved thanks to self-assembled nanostructures. NiO on DNA as the anode shown an enhancement in the battery performance keeping 98% of the battery capacity after 150 charge/discharge cycles<sup>252</sup>. DNA is also used to functionalize carbon nanotubes with<sup>253</sup> or without<sup>254</sup> FePO<sub>4</sub> nanoparticles leading to high performance cathodes. In LIB cathode, FePO<sub>4</sub> nanoparticles are material extensively used but lack of electron conductivity. Apart from DNA, which promotes the electron conductivity in FePO<sub>4</sub> nanoparticles, phenylalanine-phenylalanine (FF) nanofiber was also used to this end<sup>255</sup>. Remarkably, FF has the same inherent electron conductivity as DNA. Indeed, Akdim et al.<sup>259</sup> showed that aromatic dipeptides present naturally electron conductivity thanks to the  $\pi$ - $\pi$  stacking of the side chains. Tao et al.<sup>260</sup> for their part demonstrated that even with an enhancement of the temperature the conduction of electrons in the dipeptide stays the same. Interestingly, the ion conductivity of the peptide nanotubes remains even if the nanotubes are dried<sup>261</sup>. Susapto et al.<sup>256</sup> showed for their part that an amphiphile peptide, Lauryl-VVAGEK(phosphonoacetyl)-Am, coupled with FePO<sub>4</sub> and carbon nanotubes is a suitable composite material for the cathode in LIB (Figure 21.a). The composite FF + Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> also showed suitable characteristics for the cathode in LIB<sup>257</sup>. Interestingly, the tubular structure of Tobacco Mosaic Virus was modified with a cysteine residue enabling its attachment to gold surface and a metallization of the TMV structure with palladium and nickel to create a new type of electrode for NiO-Zn batteries. TMV structure allows an enhancement of the electrode capacity by 2-fold<sup>258</sup>. DNA was used as a scaffold to create NiCo<sub>2</sub>S<sub>4</sub> electrode holding 90.5% of the device capacity after 1500 cycles of charge/discharge<sup>262</sup>. In a more general way, metallization of DNA is used to create a high-performance electrode for LIB<sup>252</sup>.



**Figure 21.** Self-assembled building blocks for energy storage. Schematic illustration (Left) and cycle performance at different current densities (Right) of the devices. **a.** Peptide self-assembly for LIB cathode. Adapted from Reference<sup>256</sup>. **b.** Crosslinked chitosan based binder LIB. Adapted from Reference<sup>247</sup>. **c.** BCP based separator for LIB separator. Adapted from Reference<sup>243</sup>. **d.** Protein based nanofilter for polysulfides trapping in Li-S batteries. Adapted from Reference<sup>263</sup>.

### 2.5.2.2. Binders

In LIB, anodes are usually in graphite but can also be in silicon. However, as the charge/discharge cycles go on, the volume of the anode change leading to a progressive dislocation of the silicon layer thus to a loss of the anode capacities. To overcome this issue, usually binders are put on the electrode. Binders are polymers (commonly polyvinylidene fluoride, PVDF) allowing the stabilization of the active and conductive materials onto the electrode to enhance the lifetime of the electrode. Wang et al.<sup>241</sup> showed that the thickness of a silicon electrode with poly(vinylidene fluoride)-b-poly(tetrafluoroethylene) as binder only increase by 8.6  $\mu\text{m}$  contrary to the use of PVDF only which leads to an increase of 26.5  $\mu\text{m}$ . Chen et al.<sup>247</sup> have tested glutaraldehyde cross-linked chitosan as binder. The use classic PVDF binder leads to a complete loss of the battery capacity after 3 cycles while the battery with cross-linked chitosan keep its capacities after 20 cycles (Figure 21.b). Gao et al.<sup>248</sup> also used cross-linked chitosan for binder applications but this time with antimony anode. This is a promising anode for battery as it has a theoretical capacity two times higher than graphite based materials<sup>264</sup>.

### 2.5.2.3. Electrolyte

As presented in the solar cell section, liquid electrolyte is sometimes an issue for the energy devices. In batteries, liquid electrolyte can be replaced by a conductor polymer such as BCP. They are good candidates for lithium ion batteries as electrolyte because of their tunable mechanical properties depending on the blocks used but also for the high ion conductivity<sup>265,266</sup>, an essential feature for electrolyte material. Thus, BCP can physically separate ionic zone from non-ionic zone promoting the charge transport<sup>242,244</sup>. The augmentation of the ionic conductivity in LIB electrolyte is possible through a DNA-templated nickel cobalt sulfide<sup>267</sup>.

In zinc-ion batteries, polyacrylamide-coupled chitin nanofiber show not only an enhancement of the  $\text{Zn}^{2+}$  ion conductivity but also a better flexibility<sup>245</sup>. Rani et al.<sup>250</sup> coupled carboxymethyl cellulose with an ionic liquid to conduct  $\text{Na}^+$  ion in sodium-ion batteries.

### 2.5.2.4. Separator

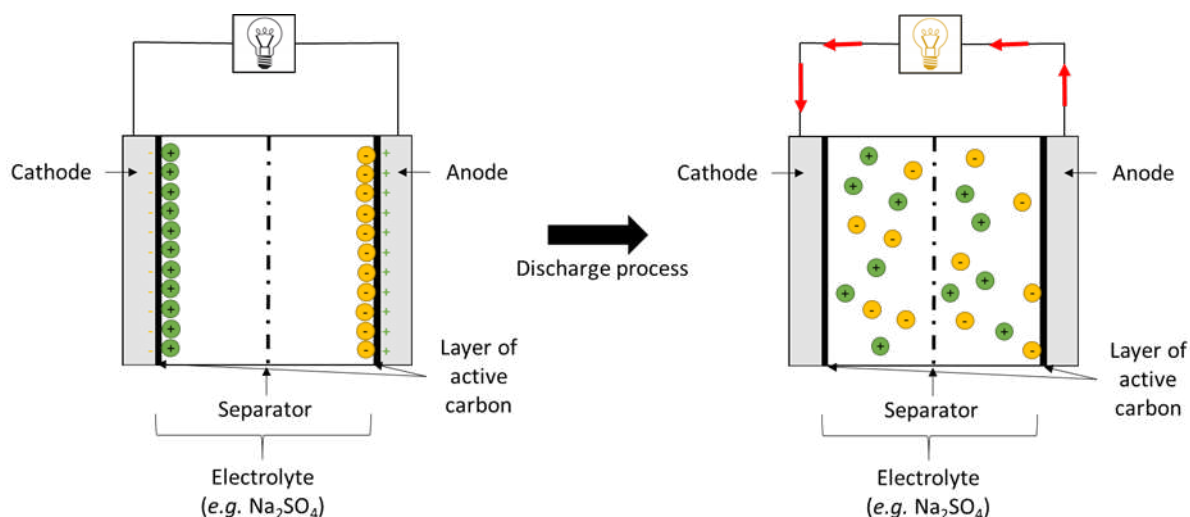
To be a suitable material for the separator role, the material must resist to high temperature as the phenomenon of charge/discharge generates heat but has to conduct ions. Yang et al.<sup>243</sup> used the BCP poly(sulfone)-b-poly(ethyleneglycol) presenting a better wettability than commercial separators leading to a higher density ion lithium inside so a better conductivity (Figure 21.c). Jiang et al.<sup>268</sup> showed that a composite material made of cellulose nanofibrils, PEG and laponite depicts ion conductivity three times higher than conventional separators. In Li/Na battery type, chitin nanofiber was also used as a separator showing an ion conductivity of  $0.064 \text{ mS.cm}^{-1}$ <sup>246</sup>.

### 2.5.2.5. Li-S Battery

Conventional LIB are reaching the maximum of the theoretical capacity:  $265 \text{ Wh.kg}^{-1}$ . Lithium sulfur batteries could overcome this issue with a theoretical capacity of  $2600 \text{ Wh.kg}^{-1}$ . But, in this type of battery, polysulfides are created leading to a rapid decrease in the battery capacity because these molecules are directly deposited on the anode or the cathode<sup>269</sup>. Fu et al.<sup>263</sup> used polysulfide nanofilter based on gelatin protein to trap the polysulfides (Figure 21.d). The same group<sup>270</sup> created a binder made of soy protein and poly(acrylic acid) (PAA). Soy protein allow a trapping of the sulfide thanks to the polar group of the amino acid. The battery made out of this composite material retain 99.3% of its capacities after 200 cycles.

### 2.5.2.6. Supercapacitor

Another type of storage devices is supercapacitor. As batteries, they are able to stock and deliver energy through ions but without the need of a redox reaction. This allows a quasi-immediate charge or discharge process. They are composed of two facing electrodes with activated carbon on their surface. Between the electrodes, there is an electrolyte with positive and negative ions. A separator is present to prevent electrodes from contacting each other. By applying a voltage, the ions from the electrolyte will be adsorbed on the corresponding electrode near the activated carbon. When the supercapacitor discharges, the ions move away from the electrodes (Figure 22).



**Figure 22.** Schema of the principle of a supercapacitor.

The electrolyte choice is very important as it participates in the stability of the supercapacitor<sup>271</sup>. Jiao et al.<sup>272</sup> have studied composite polymer based on cellulose nanofibrils to create an electrolyte but also an electrode for paper-based supercapacitor resulting in an energy density of  $1.016 \text{ Wh.kg}^{-1}$ . Islam et al<sup>273</sup> used cellulose nanofibrils as a separator demonstrating an energy density of 1.2 fold compared to conventional membranes and retain 100% of the capacity even after 5000 charge/discharge cycles. They also showed that the thinner the cellulose material is the larger pore are leading to bad separation of the charges so the battery is rapidly unusable.

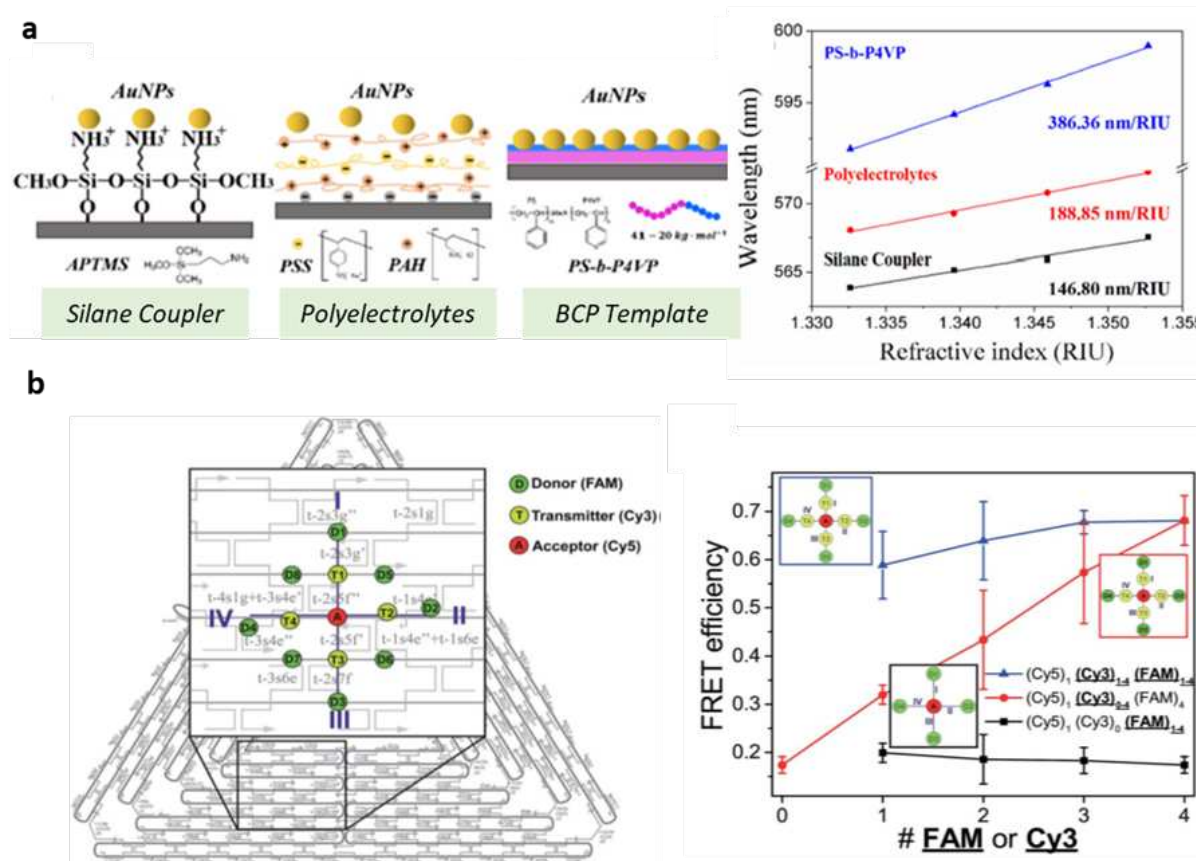
## 2.6. Biosensing

Nowadays, biosensing is a concern in multiple fields including diagnostic, food and environmental monitoring. A biosensor is composed of four main components. First, there is the (bio)receptor which is able to detect a specific target (*i.e.* the studied molecule). This (bio)receptor is disposed on an interface structure enabling the recognition to be traduced in a measurable physical or chemical signal. Then, *via* a transducer, this signal is translated into electric signal allowing its analysis via an electronic system. Part of the sensing properties of a biosensor will depend on i) the sensitive and the specific abilities of the material allowing the recognition of the target, ii) the interface structure which plays an important role for amplifying the signal. These two points can be modulated with self-assembled lattices. Indeed, DNA origamis, with their programmable shapes, have been studied to create new materials for sensing purposes<sup>274,275</sup>. The same goes for BCP<sup>276</sup> and cellulose/chitin self-assembly<sup>277</sup>. Peptide for their part can be used as recognition elements, scaffold and sometimes allow an enhancement of the biosensors signal<sup>278</sup>. S-layer proteins are used for biosensors most of the time as

template<sup>279</sup>. The major advantage for DNA, peptide and protein are the mild conditions in which the nanostructures are prepared compatible with a wide range of analytes.

### 2.6.1. Biophysical Signal Enhancement

The nanometric lattices are also used to enhance the biosensor signal through the nanostructuring of the interface. First, surface enhanced Raman scattering (SERS) signals are improved when metallic nanoparticles are well arranged side by side on the surface. It leads to an optimized Raman scattering with the creation of a hot spot between the nanoparticles. Zhou et al.<sup>280</sup> took advantage of DNA origami to direct the assembly of gold and silver nanoparticles leading to an increase SERS signal of 4-mercaptobenzoic acid. Similarly, Prinz et al.<sup>281</sup> used triangle origami to create hot spots with gold nanoparticles 25nm away from each other. Taking advantage of the regular shapes of origamis, Kühler et al.<sup>282</sup> also showed a creation of nanoantenna allowing an enhancement in the Raman signal of the studied molecule. Secondly, local surface plasmonic resonance (LSPR) signals are, as SERS, improved with the use of nanoparticles. By templating surface with poly(styrene)-b-poly (4-vinylpyridine) (PS-b-P4PV), a BCP, Lu et al.<sup>283</sup> obtained well dispersed gold nanoparticles layer. This latter enhanced the refractiveindex by two compared to the usual silane template (Figure 23.a). Shin et al.<sup>284</sup> showed a hexagonal structure of poly(styrene)-block-poly(methyl methacrylate) in which silver is put inside the pores after annealing leading to an enhancement of the LSPR signal. Förster resonance energy transfer (FRET) signal can also be improved by templated origami with multiple antennae but a unique acceptor<sup>285</sup> (Figure 23.b). Dipeptide self-assembly can also be used to coordinate porphyrin with precise distance between the porphyrins allowing FRET to occur<sup>286</sup>.



**Figure 23.** Self-assembled building blocks for biophysical signal enhancements. Schematic illustration (Left) and enhancement performance (Right) of the self-assembly. **a.** BCP based gold nanoparticle self-assembly for LSPR signal. Adapted from Reference<sup>283</sup>. **b.** DNA origami for FRET signal enhancements. Adapted from Reference<sup>285</sup>.

### 2.6.2. Sensitivity Improvement

The nanopatterning of surfaces by nanostructures made of self-assembled molecules often leads to an enhancement of the biosensor's sensitivity. The structure of DNA can be used to amplify the signal of a biosensor through electron transport toward an electrode thanks to the phosphate groups. This resulting in a 100-fold lower detection limit of HER2 a marker of invasive breast cancer<sup>287</sup>. Electrode modified with FF + 4-mercaptopyridine allows the detection of urea as it facilitates the oxidoreduction reaction between gold and urea<sup>288</sup>. Interestingly, FF nanoforest modified electrodes depict a sensitivity 17 fold better than unmodified electrodes to sense phenol<sup>289</sup>. Using S-layer, Conroy et al.<sup>290</sup> created a biosensor able to detect amount of uranyl down to  $10^{-12}$  M.

### 2.6.3. Nanoparticle Catalysis

In the biosensor field, the self-assembled mesoporous structures are used as a scaffold for catalysis related nanoparticles. The reaction catalyzed by the nanoparticles are useful for monitoring specific analytes in body fluids such as urine or blood. Naghdi et al.<sup>291</sup> created paper sensors based on chitin nanofiber functionalized with a wide range of nanoparticles allowing a detection of the analyte by a change in the paper color. They detected presence of albumin, glucose and bilirubin directly from blood samples with the same accuracy as common methods. In the future, this kind of platform could replace the classic blood test made in laboratory. Zhao et al.<sup>292</sup> used chitosan to be a template for zinc

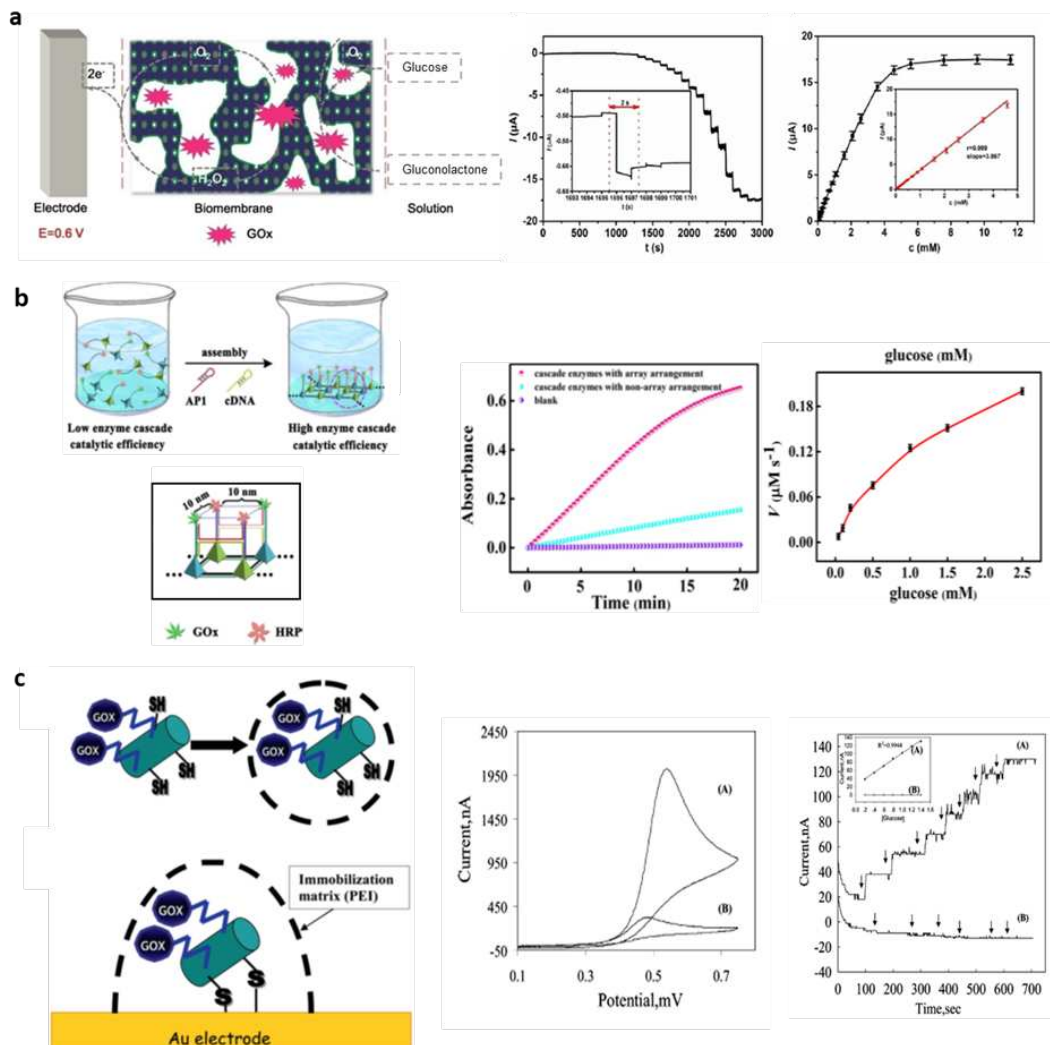
oxide mesocrystal allowing a better reproducibility in the biosensor abilities. This was used to sense glucose by cyclic voltametry method with potential applications for diabetes monitoring. In another work on urine samples this time, the self-assembly of the dipeptide FF was functionalized with ZnO to create a biosensor for trypsin detection as this enzyme referencelects the healthy state of the pancreas<sup>293</sup>.

#### 2.6.4. Enzyme Immobilization

Monitoring the analytes of the body is often made by the use of a specific enzyme. However, enzymes are fragile proteins, which can be unstable in solution and have a one-time utilization. Enzyme immobilization on self-assembled scaffold can prevent instability and offer the possibility to reuse the enzyme afterwards. As a first example of proof of concept for enzyme immobilization, chymotrypsin, a pancreatic activity marker, was immobilized through EDC/NHS on chitin nanofibrils. The oxidation degree of the chitin is correlated with the amount of chymotrypsin immobilized onto the nanofibrils<sup>294</sup>. Diaz-Cabellero et al.<sup>295</sup> designed biotinylated heptapeptide depicting prion-like structure and enabling horse radish peroxidase (HRP) functionalization through streptavidin. The majority of the enzyme immobilization works are for glucose oxidase (GOx) orientation. This protein is widely used to monitor glucose. First, GOx can be precisely orientated on the self-assembled scaffold. Gong et al.<sup>296</sup> used cellulose as scaffold for a fusion protein composed of the glucose oxidase protein and a domain called carbohydrate binding module family 2 allowing the specific orientation of the GOx on the surface of the cellulose. In the same way, Guo et al.<sup>297</sup> immobilized GOx on PS-b-P4PV at an electrode surface. The use of the BCP structure enhance the electrons transfer toward the electrode (Figure 24.a) leading to glucose detection. Similarly, Lee et al.<sup>298</sup> used poly(ferrocenyldimethylsilane-*b*-isoprene) as BCP to immobilize GOx then to conduct electrons toward the electrode for glucose detection but also for biofuel applications. In another work, Neubauerova et al.<sup>299</sup> developed a nanocellulose-based biosensor to detect glucose thanks to the detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by HRP and its associated chromogen, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS). Based on this enzymatic cascade, Wang et al.<sup>300</sup> used DNA tetrahedrons to create a lattice in which GOx and HRP are alternated with a constant distance of 10 nm (Figure 24.b).

GOx is not the only protein immobilized thanks to self-assembled lattices. For example, Yemini et al.<sup>301</sup> also used FF nanotubes as a template to support GOx and alcohol dehydrogenases protein leading to detection of either glucose or ethanol (Figure 24.c). Xu et al.<sup>302</sup> used poly(styrene)-*b*-poly(acrylic acid), to immobilize hemoglobin to do electrocatalysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> paving the way to future electrochemical glucose biosensors. FF self-assembly was also used to immobilize HRP leading to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor able to detect the oxidative stress in HeLa cells<sup>303</sup>. Using advantageously the precise placement of the enzymes on DNA origami, Chen et al.<sup>304</sup> showed an enzymatic cascade composed of the glucose-6-phosphate dehydrogenase and the lactate dehydrogenase mediated by a photosensitive molecule allowing the reactions to happen if light is on. They also showed a modulation in the cascade response depending on the distance between the enzymes. This could be useful for biomedicine as it can precisely drive the substrate channeling.

In food monitoring applications, Sun et al.<sup>305</sup> showed immobilization of two enzymes, HRP and 5'-nucleotidase, thanks to polypyrrole block copolymer leading to a diminution of the inosin monophosphate limit of detection.



**Figure 24.** Self-assembled building blocks for enzyme immobilization. Schematic illustration (Left) and performance characteristic curves (Right) of the material. **a.** BCP based biosensor for glucose sensing. Adapted from Reference<sup>297</sup>. **b.** DNA tetrahedron lattice for enzymatic cascade support detecting glucose. Adapted from Reference<sup>300</sup>. **c.** Peptide nanotubes for Gox support and glucose detection. Adapted from Reference<sup>301</sup>.

As summary of this section, the principal characteristics of the above describes biosensors are detailed in the table 3.

Type of building blocks / sensitive molecule	Method of detection	Analyte detected	Linear range	Limit of detection	Reference
<b>Cellulose</b>					
Nanocellulose / GOx	Electrochemistry	Glucose	1.25 - 40 mM	0.475 mM	296
Nanocellulose / HRP	Colorimetric	Glucose	1.5 - 12.8 mM	ND	299
<b>Chitin</b>					
Chitosan / ZnO + GOx	Cyclic voltametry	Glucose	0.05 - 0.3 mM	ND	292
<b>BCP</b>					
Polypyrrole / gold nanoparticle + GOx	Electrochemistry	IMP	0.05 – 15 g.L <sup>-1</sup>	3.85 ng.mL <sup>-1</sup>	305
PS-b-P4PV / GOx	Electrochemical impedance spectroscopy	Glucose	10 – 4500 μM	0.05 μM	297
<b>DNA</b>					
ssDNA	Cyclic voltametry	HER2	1 - 100 pg.mL <sup>-1</sup>	0.047 p.mL <sup>-1</sup>	287
Tetrahedron / GOx + HRP	Volta maperometry	Thrombin	1 pM - 10 nM	0.32 pM	300
<b>Peptide</b>					
FF / ZnO	Fluorometry	Trypsin	0 - 160 ng.mL <sup>-1</sup>	0.1 ng/mL	293
FF / HRP	Cyclic voltametry	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.1 - 60 μM	18 nM	303
FF / mercaptopyrindine	4- Cyclic voltametry	Urea	0.1 – 1 mM	0.06 mM	288
FF / GOx + ADH	Amperometry	• Ethanol • Glucose	• 20 μM - 400 μM • 0.2 mM - 1.4 mM	ND ND	301
FF / hGH antibodies	Electrochemical impedance spectroscopy	hGH	1 - 100 pg.mL <sup>-1</sup>	0.38 pg.mL <sup>-1</sup>	306
FF / CNT	Electrochemistry	Phenol	ND	50 nM	289

**Table 3.** Self-assembled building blocks for biosensing applications. \*ND: Non Described.

### 3. Conclusion and Outlook

In this review, we highlighted the most commonly used self-assembled building blocks BCP, cellulose, chitin, DNA, peptide and protein with an emphasis on how to construct porous lattices based on these molecules. Their nanopatterning onto surface is a crucial aspect for their use in electronics, energy production or storage and biosensing. The tunability of the mesoporous nanostructures leads to physical properties (deformation, functionalization, resistivity...) changes, which can be adapted

depending on the targeted application. Although these nanostructures are increasingly implemented in nanotechnological devices, some of them are still underused. For example, DNA origamis are used in nanolithographic process or in the biosensors field but only dsDNA is used for energy applications. Yet, the precise grafting enabling with the DNA origami could serve as a template for dyes in DSSC. Moreover, as DNA has intrinsic abilities for electron conduction, we can then wonder how behave the electron transfer in a DNA origami alone.

These self-assemblies consist of an important technological breakthrough with a paradigm shift that requires an important interdisciplinarity in this field of research. Despite the increasing understanding of self-assembly mechanisms *in vitro*, there is a need to precisely predict the behavior of the building blocks before the self-assembly. These data extracted from experiments as well as *de novo* calculations should serve for *in silico* simulation. The main purpose in these *in silico* predictions is the visualization of the interactions and so the final shape of this material as well as its properties. Thus, the integration of these mesoporous materials in nanotechnological devices will be facilitated.

Although these materials are cheap and easily available, this lack of reproducibility is also a major hurdle to widely used these materials as main components in the nanotechnological field. It appears that addressing the question of reproducibility is mandatory in the future. Moreover, we also believed that efforts should be devoted to understanding the surface/self-assembly interface to optimize the whole device. This understanding could also be used to direct self-assembly more precisely and thereby probably reduce the defaults in the self-assemblies.

Overall, self-assembly of molecules for nanopatterning uses is a hot field with exciting achievements. The skyrocketing number of works dedicated to this topic promises great perspectives for the future of nanotechnology.

## 1.3 Caractérisation des auto-assemblages

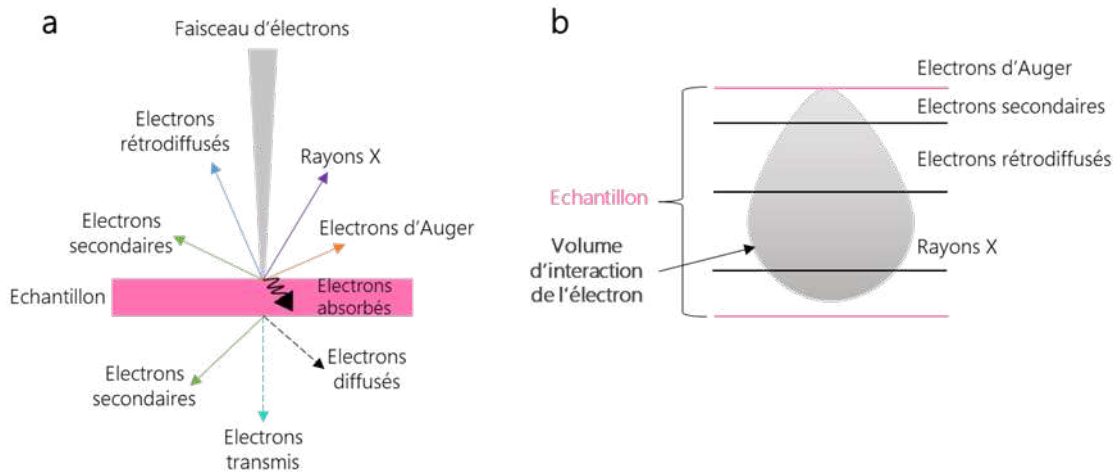
La morphologie des auto-assemblages est un point clé dans leur utilisation pour des applications en nanotechnologie. Du fait de leur taille nanométrique, il est essentiel d'utiliser des techniques de pointe pour caractériser leur homogénéité physique. Deux techniques parmi celles existantes ont été choisies et utilisées pour analyser la structure physique et chimique de notre biomatériau protéique : la microscopie électronique et la microscopie à force atomique. La section suivante a pour but de donner les principales clés de compréhension associées à ces microscopies. D'une part, le principe général de la microscopie électronique, de ses modes d'imagerie et d'analyse chimique seront présentés. D'autre part, le principe de la microscopie à force atomique sera détaillé ainsi que ces principaux modes de fonctionnement.

### 1.3.1 La microscopie électronique

#### 1.3.1.1 Principe général

La microscopie électronique (*Electron Microscopy*, EM) est basée sur l'interaction entre les électrons et la matière. Elle permet d'explorer la structure de matériaux avec des résolutions très élevées pouvant dépasser l'Å pour les microscopes les plus performants et ainsi permettre la visualisation des atomes. D'un point de vue technique, les microscopes sont équipés d'un canon à électrons situé en amont de l'échantillon et générant le faisceau électronique. Il existe quatre types de sources utilisées en microscopie électronique : les filaments de tungstène, les pointes LaB<sub>6</sub>, les canons à effet de champ et les sources Schottky. Dans les sources utilisant un filament de tungstène, la cathode est chauffée à haute température (plusieurs milliers de Kelvin) permettant l'émission des électrons par effet thermoionique. Les électrons obtenus sont ensuite accélérés dans la colonne avec un haut voltage qui peut être ajusté dans une gamme plus ou moins importante en fonction du microscope utilisé. La valeur optimale de la haute tension dépend du matériel observé et du type d'analyses effectuées. Dans la colonne du microscope, les lentilles électromagnétiques sont utilisées pour façonner un faisceau d'électrons avec des caractéristiques données au niveau de l'échantillon. Ainsi l'échantillon sera éclairé par un faisceau parallèle dans un microscope à transmission tandis que le faisceau sera convergent dans un microscope à balayage. L'ensemble de ces éléments se trouvent dans un vide poussé pour prévenir la déviation et l'absorption des électrons pouvant être causée par les molécules de l'air.

Lorsque les électrons du faisceau rencontrent l'échantillon, différents rayonnements peuvent se produire et entraîner l'émission d'électrons ou de rayons X (Figure 1.2.a). Les électrons constituant le faisceau électronique peuvent traverser l'échantillon s'il est suffisamment mince et vont être plus ou moins déviés et perdre une quantité d'énergie en fonction des interactions subies. La nature de ces rayonnements émis dépend de la nature de l'échantillon et de la profondeur que l'électron peut atteindre au sein de celui-ci (Figure 1.2.b). Cela aboutit à la création de différents signaux qui fournissent des informations sur la nature de ce dernier. Par exemple, les électrons secondaires éjectés par un phénomène de diffusion inélastique sont utilisés dans les microscopes à balayage pour obtenir des informations sur la topographie de la surface car ils sont produits très près de la surface de l'échantillon. Les électrons rétrodiffusés quant à eux, sont plus sensibles à la densité électronique des atomes composants l'échantillon (sensibilité au numéro atomique  $Z$  des éléments) ce qui contrastera les images en fonction de la masse des éléments observés.



**Figure 1.2** : L'interaction entre les électrons et la matière aboutit à la formation de différents rayonnements (a). C'est la profondeur de pénétration des électrons (b) qui détermine la nature du rayonnement émis. Adapté de la référence <sup>307</sup>.

### 1.3.1.2 Différents modes de microscopie électronique

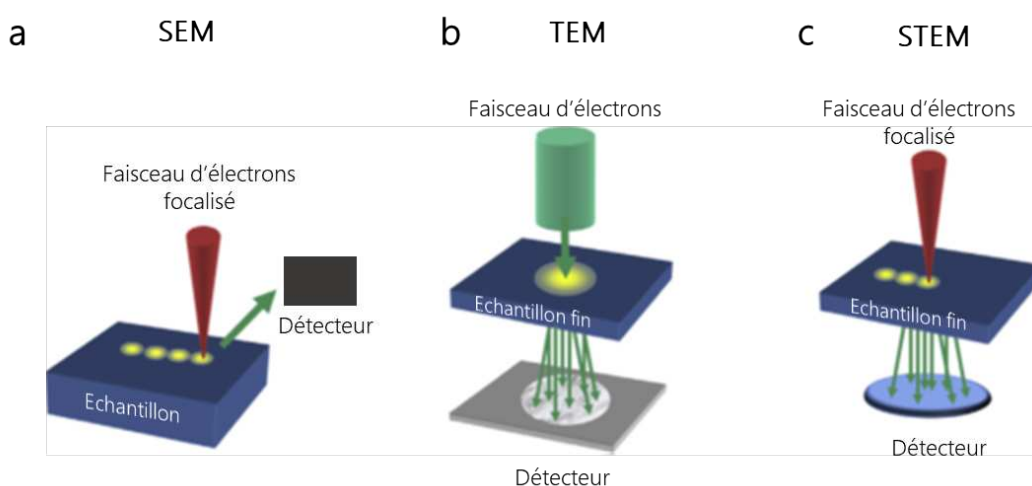
Il existe différents types de microscopie électronique :

- La microscopie à balayage (SEM)
- La microscopie en transmission (TEM)
- La microscopie à balayage et en transmission (STEM)

Dans la microscopie à balayage (Figure 1.3.a), le faisceau d'électrons est focalisé et utilisé comme un pinceau qui est balayé sur l'échantillon et est déplacé sur celui-ci. La tension appliquée aux électrons est comprise typiquement entre 1 et 30 kV. La SEM est basée sur les signaux des électrons secondaires et des électrons rétrodiffusés. Les détecteurs pour ces deux types d'électrons sont positionnés en amont de l'échantillon. Il est ainsi possible de détecter les électrons secondaires, les électrons rétrodiffusés ou les deux. Le signal de ces électrons est mesuré pour chaque position du faisceau sur l'échantillon et l'image est obtenue point par point.

Dans la microscopie en transmission (Figure 1.3.b), le faisceau éclaire parallèlement l'échantillon de manière similaire à la microscopie optique. La tension dans ce type de microscopie est située entre 80 et 300 kV. L'épaisseur de l'échantillon doit être suffisamment fine (< 100 nm) pour que les électrons puissent être transmis à travers celui-ci. Ils sont alors détectés sur un écran fluorescent ou une caméra CCD situé en aval de l'échantillon. Cela permet de visualiser directement toute la surface l'échantillon éclairée par le faisceau en obtenant une image agrandie de celui-ci.

Le mode de microscopie utilisé tout au long de ma thèse est la microscopie à balayage et en transmission (STEM) (Figure 1.3.c). Ce mode est une combinaison du SEM et du TEM. Les tensions vont typiquement de 20 à 200 kV. Dans ma thèse, ce mode a été utilisé dans un microscope à balayage avec une tension d'accélération entre 20 et 30 keV. Le faisceau d'électrons balaye la surface de l'échantillon et l'image de celui-ci est produite grâce à la collecte des électrons sur un détecteur situé en aval de l'échantillon. Dans cette technique, les électrons diffusés au travers de l'échantillon peuvent être collectés en utilisant différents types de détecteur. En effet, lorsque les électrons du faisceau interagissent avec le nuage électronique des atomes de l'échantillon, ils sont déviés en fonction de la densité de ce nuage. Plus il est dense, plus l'angle de déviation de l'électron du faisceau incident est important. Ainsi, le détecteur *bright field* (BF) collecte les électrons qui sont peu déviés tandis que le détecteur *dark field* (DF) permet la collecte d'électrons plus déviés. A épaisseur égale, l'intensité de contraste dans les images DF est proportionnel au numéro atomique Z de l'atome, plus l'atome est lourd plus il apparaît brillant. Le contraste des images dépend de la capacité qu'à l'échantillon à dévier les électrons et ce phénomène dépend de la densité électronique de l'échantillon. L'observation d'échantillons uniquement composés d'atomes légers comme les protéines qui sont constitués majoritairement de carbone, d'oxygène, et d'azote, ne conduit pas à un contraste permettant une observation de la structure. Ainsi, les échantillons biologiques sont souvent marqués avec des métaux lourds comme de l'acétate d'uranyle<sup>308</sup> ou de l'osmium<sup>309</sup>. Ces métaux interagissent avec l'échantillon et forment des cristaux



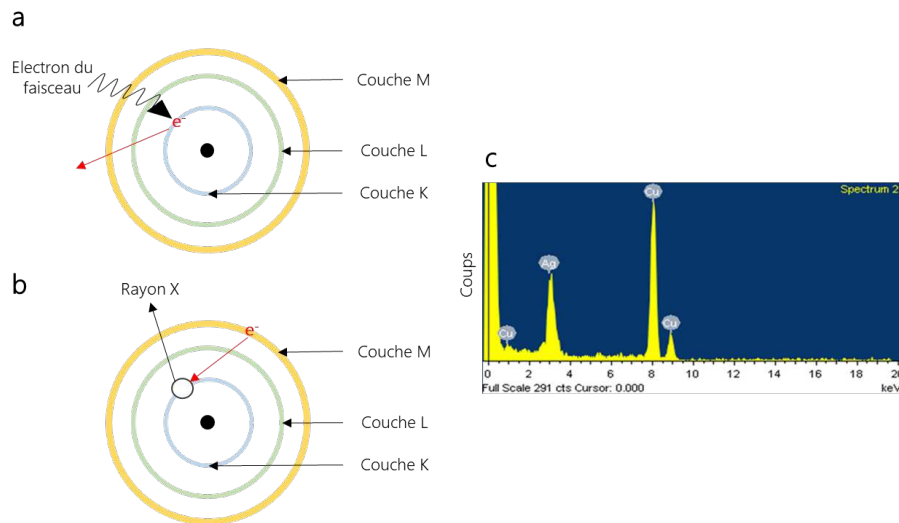
lors du séchage. Ce sont ces cristaux de métaux lourds qui donnent le contraste dans les images.

**Figure 1.3 :** Représentation schématique des différences entre le SEM (a), le TEM (b) et le STEM (c). Adapté de la référence<sup>310</sup>.

### 1.3.1.3 Analyse chimique : la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie

La spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (*Energie-dispersive X-ray spectroscopy*, EDX) est une technique permettant une analyse élémentaire de l'échantillon. Elle détecte les rayons X émis par l'échantillon après interaction avec le faisceau d'électrons. Ce rayonnement se produit, de manière non systématique, lorsqu'un électron du nuage électronique est arraché d'un atome de l'échantillon laissant derrière lui un niveau électronique vide (Figure 1.4.a). Ce niveau est rapidement comblé par un électron d'une couche supérieure (Figure 1.4.b) et conduit à l'émission d'un rayon X caractéristique de la nature de l'atome ainsi que de la transition électronique induite. Ces rayons X sont ensuite collectés par un détecteur adapté. Ceci permet d'avoir un spectre (Figure 1.4.c) représentant les énergies de tous les rayons X caractéristiques

des atomes de l'échantillon. Il est aussi possible de réaliser des cartographies élémentaires de l'échantillon permettant d'associer chaque pixel d'une image EM à une composition chimique.

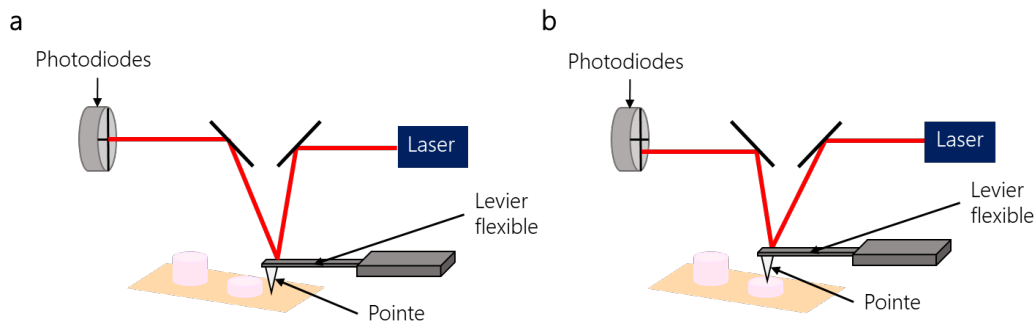


**Figure 1.4 :** L'interaction entre les électrons du faisceau arrache un électron de la couche K d'un atome de l'échantillon (a) laissant une case vacante qui sera remplie par un électron d'une couche supérieure, ici de la couche M, émettant ainsi un rayon X (b). La collecte de ces rayons X aboutit à la création d'un spectre (c). Spectre EDX tiré de la référence<sup>311</sup>.

## 1.3.2 La microscopie à force atomique

### 1.3.2.1 Principe général

La microscopie à force atomique (*Atomic force microscopy*, AFM) est une technique permettant de visualiser la topographie de surface d'un échantillon. Son principe de fonctionnement repose sur les forces d'attraction ou de répulsion entre une pointe, attachée à un levier souple, et la surface de l'échantillon. Ce couple pointe/levier est associé à un système optique impliquant un laser visant la surface de la pointe. Le laser est alors réfléchi sur un quadrant de photodiodes (Figure 1.5.a). Lorsque la pointe se déplace sur la surface de l'échantillon, le laser est dévié en conséquence ce qui permet de mesurer la hauteur de l'échantillon. Les expériences d'AFM sont réalisées sous atmosphère contrôlée ou non. De plus, il est possible de réaliser les scans AFM soit à l'air avec un échantillon sec, soit en liquide en déposant une goutte de liquide sur l'échantillon pour le garder humide.

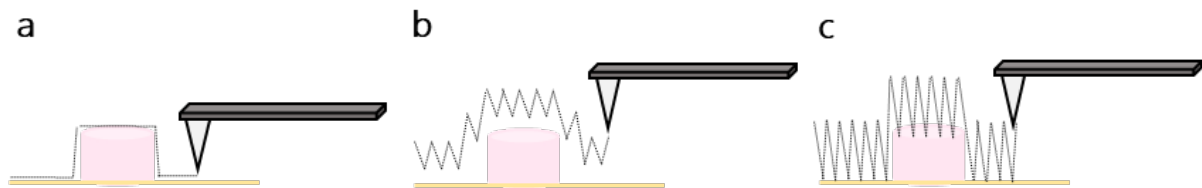


**Figure 1.5 :** Principaux éléments d'un microscope à force atomique (a). Lorsque la pointe se déplace sur l'échantillon et rencontre une différence de hauteur, le laser va être dévié sur les photodiodes (b).

### 1.3.2.2 Modes d'utilisation

Il existe trois modes d'utilisation pour l'AFM :

- Le mode contact,
- Le mode non contact,
- Le mode contact intermittent.



**Figure 1.6 :** Représentation schématique du mode contact (a), non contact (b), contact intermittent (c). Les tracés en pointillés représentent le trajet de la pointe dans chaque mode.

Dans le mode contact (Figure 1.6.a), la pointe suit le relief de la surface par des phénomènes de répulsion entre la pointe et l'échantillon. Le levier subit alors des mouvements de torsion et de flexion qui traduisent la topographie de la surface de l'échantillon. Bien que ce mode soit rapide, il peut endommager les échantillons et est très sensible à la présence de contaminants sur la surface.

Comme l'indique son nom, dans le mode non contact (Figure 1.6.b), il n'y a pas de contact entre la pointe et l'échantillon. Le levier vibre à sa fréquence de résonance en appliquant une faible amplitude. Les forces attractives et répulsives agissant entre la pointe et l'échantillon vont entraîner une modulation de cette fréquence qui traduit la topographie de la surface. Le problème de ce mode est qu'il est moins résolutif que le mode contact.

Le mode contact intermittent (Figure 1.6.c) quant à lui, repose sur le même principe que le mode non contact mais avec une amplitude plus grande ce qui permet de toucher l'échantillon de manière ponctuelle. C'est ce mode qui a été utilisé dans ces travaux de thèse car il permet de préserver les structures étudiées du fait des faibles temps de contact entre la pointe et l'échantillon.

La réduction du temps de contact entre l'échantillon et la pointe permet aussi de préserver la pointe utilisée. En effet, le pouvoir résolutif de l'AFM repose essentiellement sur le diamètre de la pointe qui varie de quelques nm et quelque dizaine de nm.

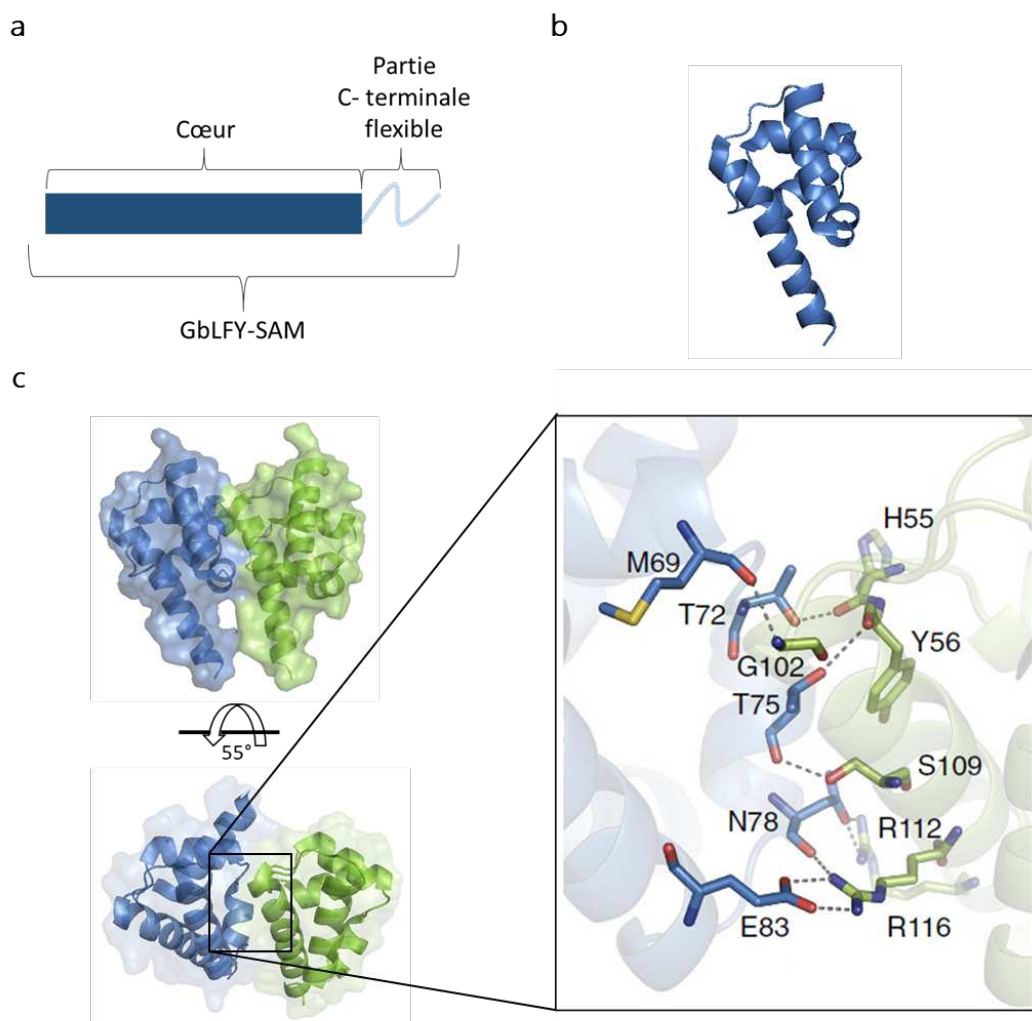
## 1.4 Conclusion

Que ce soit à des fins de diagnostic pour détecter des substances d'intérêt en très faible quantité ou à des fins environnementales dans le cas de dispositifs photovoltaïque ou électronique, le nanopatterning de surface est un élément clé dans le domaine de la nanotechnologie. Plus la distance entre les motifs est petite, meilleures sont les performances des dispositifs. L'auto-assemblage de briques de base permet de contrôler la topographie de surface afin de créer des motifs réguliers présentant un pitch inférieur à 20 nm.

Une multitude de briques de base sont étudiées et utilisées dans le cadre du nanopatterning. Les réseaux basés sur les protéines, quant à eux, sont étudiés depuis les années 90 via la recristallisation de structures bactériennes appelées les S-layers<sup>177,312,313</sup>. Désormais, la création de réseaux protéiques 2D se fait majoritairement en modifiant des protéines dont les structures ont déjà été résolues et qui sont, pour la plupart, consignées dans la Protein Data Bank (PDB). Les auto-assemblages protéiques offrent par ailleurs des possibilités naturelles de greffage *via* les chaînes latérales des acides aminés comme les cystéines, les lysines ou encore les arginines. Des preuves de fonctionnalisation des pores de réseaux protéiques ont déjà été apportées par Du et al.<sup>184</sup> qui ont greffé des nanoparticules d'or grâce à des cystéines dans le réseau carré formé par la protéine RhuA (L-rhamnulose-1-phosphate aldolase). Zhao et al.<sup>181</sup> ont quant à eux greffé des quantum dots sur le réseau hexagonal formé par la protéine SP1 (specificity protein 1) aboutissant à la création d'un chloroplaste artificiel. D'une manière générale, la quantité de molécules greffées sur les auto-assemblages protéiques reste limitée. En effet, le greffage est souvent limité à une molécule par protéine et la plupart des réseaux protéiques décrits dans la littérature ne sont composés que d'une monocouche. Pour certaines applications comme la biocatalyse, le photovoltaïque ou encore les biocapteurs, il est nécessaire d'avoir un taux de greffage important et donc un auto-assemblage s'étendant en hauteur sur plus d'une monocouche protéique.

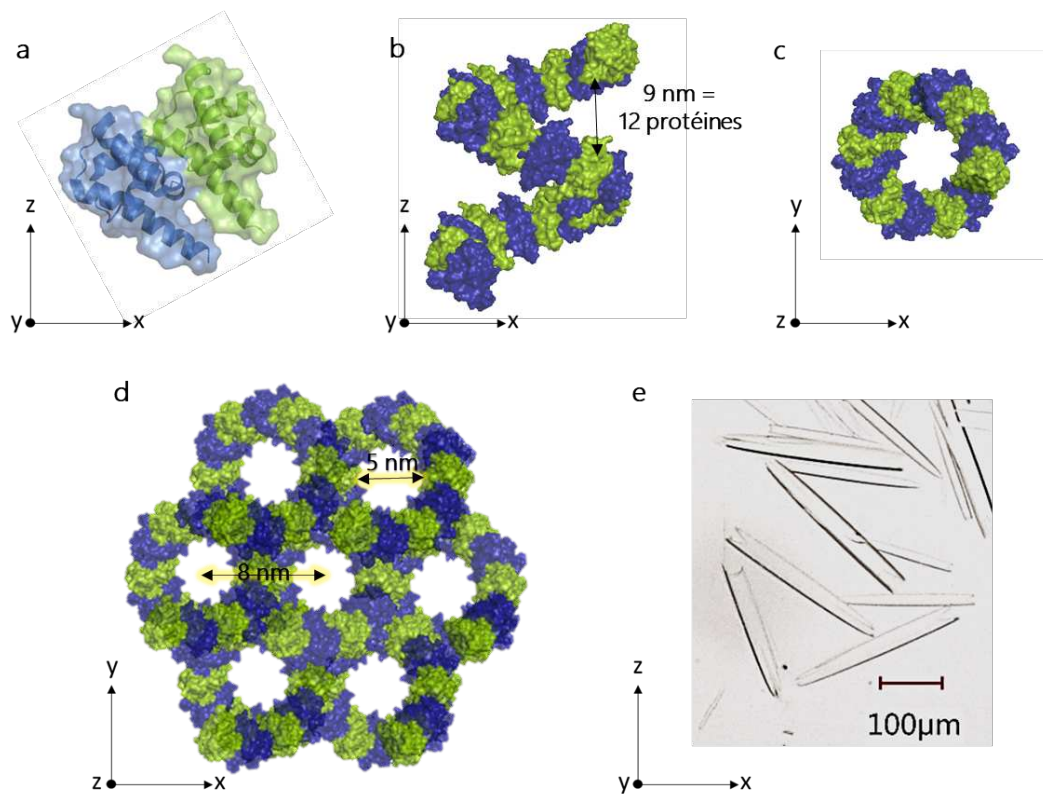
## 1.5 Projet de thèse

L'objet de mes travaux de thèse est l'étude d'un nouveau type de biomatériau protéique qui servira par la suite à nanostructurer des surfaces utilisables pour des applications notamment de biocapteurs. Plus précisément, la protéine utilisée tout au long de ces travaux est le domaine d'oligomérisation (appelé Sterile Alpha Motif, SAM) d'un facteur de transcription, LEAFY (LFY), provenant de la plante *Gingko biloba* (Gb). Ce domaine d'oligomérisation, appelé par la suite GbLFY-SAM, est présent aussi chez la protéine LFY des plantes à fleurs et a été étudié au sein de l'équipe Flo\_Re du laboratoire LPCV révélant ainsi son rôle dans le développement floral *in vivo*<sup>314</sup>. Grâce à ces travaux, la structure cristallographique de la protéine a été résolue par la technique des rayons X. Cette protéine est composée d'une succession d'hélices  $\alpha$ , qui forment le cœur de la protéine, mais aussi d'une partie mobile de 24 acides aminés présents en C-terminale (Figure 1.7.a et b).



**Figure 1.7 :** Structure et interaction de la protéine GbLFY-SAM. (a) Représentation schématique de la séquence en acide aminés de la protéine GbLFY-SAM distinguant la partie en hélice  $\alpha$  et la partie mobile. (b) Structure cristallographique (PDB: 4UDE) de GbLFY-SAM. Dans cette structure, seul le cœur de la protéine est représenté car la partie C-terminale est flexible et donc invisible en diffraction des rayons X. (c) Interaction entre deux monomères GbLFY-SAM permettant le processus d'auto-assemblage. L'encadré représente une vue détaillée sur l'interface entre ces deux monomères montrant les acides aminés impliqués dans l'interaction tête-queue. Ils sont représentés en vue bâton. Modifiée et adaptée de la référence<sup>314</sup>.

Par ailleurs, GbLFY-SAM est capable de s'auto-assembler naturellement par des interactions tête-queue au niveau du cœur de la protéine (Figure 1.7.c). Dans un premier temps, ces interactions tête-queue entre plusieurs protéines vont aboutir à la formation d'une hélice supramoléculaire (Figure 1.8.a, b et c) puis chaque hélice est capable d'interagir avec six autres hélices créant ainsi une structure en nid d'abeille (Figure 1.8.d). Dans cette structure, la partie C-terminale se retrouve à l'intérieur des pores formés. Ce nid d'abeille a particulièrement retenu notre attention car les pores formés ont un diamètre de 5 nm et la distance entre deux pores adjacents (le *pitch* de l'auto-assemblage) est de 8 nm. De plus, la formation de ces hélices supramoléculaires permet l'empilement d'au moins 12 protéines ce qui correspond à une hauteur de 9 nm. En réalité, cet empilement est naturellement beaucoup plus important puisqu'en solution les cristaux protéiques peuvent atteindre des tailles de l'ordre du demi-millimètre (Figure 1.8.d). De plus, comme la partie C-terminale se retrouve à l'intérieur des pores de la structure en nid d'abeille<sup>315</sup>, il est possible de greffer spécifiquement des molécules d'intérêt à l'intérieur de ceux-ci.



**Figure 1.8.** : Les interactions tête-queue des protéines GbLFY-SAM aboutissent à la formation d'une structure en nid d'abeille. (a) Interaction entre deux monomères GbLFY-SAM. (b) Hélice supramoléculaire formée par l'auto-assemblage des protéines GbLFY-SAM. (c) Vue du dessus de l'hélice supramoléculaire. (d) Structure en nid d'abeille formé par l'interaction de 7 hélices supramoléculaires laissant apparaître les pores. Les dimensions caractéristiques sont indiquées sur la structure. (e) Image en microscopie optique de cristaux de GbLFY-SAM en solution. Les repères orthonormés à côté de chaque image permettent de suivre la rotation dans l'espace de chaque structure présentée.

Ces caractéristiques font de cette structure en nid d'abeille un biomatériau de choix pour le domaine des nanotechnologies permettant d'une part d'avoir un pitch largement en dessous de 20 nm et d'autre part, grâce au stacking important des protéines GbLFY-SAM, d'avoir des possibilités de greffage encore jamais décrites dans la littérature et pouvant répondre aux besoins des domaines de la biocatalyse, de l'énergie ou des biocapteurs.

La première partie de ces travaux de thèse consistera en l'étude de l'ancrage et de la croissance de l'auto-assemblage formé par GbLFY-SAM sur des surfaces de différentes natures. Plus précisément, nous évaluerons :

- 1) Les possibilités d'ancrage de l'auto-assemblage de GbLFY-SAM sur une surface,
- 2) Les dimensions (*i.e* taille des pores, *pitch* et hauteur) de l'auto-assemblage,
- 3) L'aire recouverte par l'auto-assemblage protéique,
- 4) La nature des surfaces qu'il est possible d'utiliser.

Ces expériences seront validées à la fois par l'utilisation de la microscopie électronique mais aussi par l'utilisation de la microscopie à force atomique. Puis, des tests de fonctionnalisation par des ions métalliques seront mis en place. L'objectif est de faire la preuve de concept qu'il est possible de fonctionnaliser de manière spécifique les pores de l'auto-assemblage de GbLFY-SAM. La technique d'EDX sera ici mise en place afin de s'assurer de la présence des divers ions métalliques utilisés.

La deuxième partie de ces travaux de thèse sera consacrée à la modulation de la partie C- terminale pour montrer la versatilité de l'auto-assemblage et son potentiel pour la création de nanopiliers d'or. L'idée est d'introduire un ou plusieurs acides aminés spécifique(s) dans la partie C- terminale afin de diriger les ions  $Au^{3+}$  ou des nanoparticules d'or à l'intérieur des pores créant ainsi des nanopiliers en or.

Enfin, nous avons aussi évalué l'intérêt de l'utilisation de l'auto-assemblage GbLFY-SAM dans le cadre d'application de biocapteurs. Le premier type de biocapteur étudié est un biocapteur colorimétrique pour détecter du glucose. Le second type est un biocapteur basé sur la résonance des plasmons de surface pour détecter des composés organiques volatiles.



## Chapitre 2 : Ancrage, croissance et fonctionnalisation du nid d'abeille GbLFY-SAM sur surface

L'ancrage et la croissance du nid d'abeille formé par GbLFY-SAM sur différentes surfaces sont décrits dans un article publié dans *ACS Applied Nano Materials*. Dans ce même article, une première preuve de concept de la fonctionnalisation des auto-assemblages sur surface par des ions métalliques ( $\text{Au}^{3+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$ ) est aussi décrite. La première partie de ce chapitre permettra de remettre l'article dans le contexte de ma thèse afin de l'introduire. La seconde partie sera consacrée à la description d'expériences complémentaires ne s'inscrivant pas dans la portée de l'article tout en y étant intimement liées. Ces expériences permettront de préciser un peu plus la manière dont GbLFY-SAM s'auto-assemble sur la surface mais aussi de mieux comprendre la fonctionnalisation par des ions métalliques en utilisant d'autres métaux tels que le cuivre ou le zinc.

## 2.1 Présentation de l'article

### 2.1.1 Contexte par rapport aux travaux de thèse

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'ancrage de l'auto-assemblage sur des grilles de microscopie électronique en carbone. La question à laquelle nous avons voulu répondre est, comment faire pour passer des cristaux 3D en solution à des structures ancrées perpendiculairement à la surface (Figure 2.1), principal verrou de ces travaux de recherche.

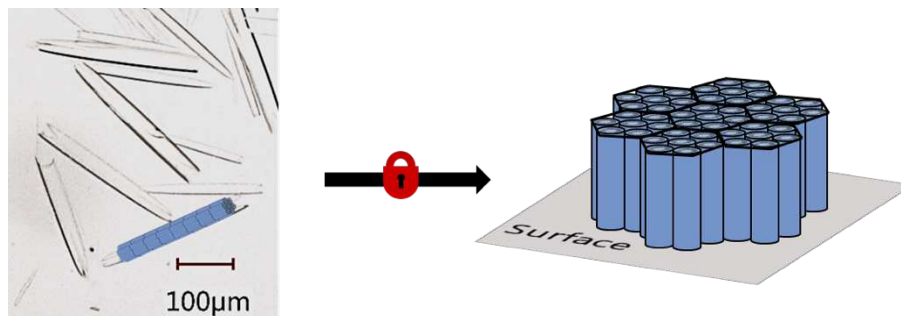


Figure 2.1 : Représentation schématique du principal verrou de mes travaux de recherche.

Nous nous sommes basés sur les travaux réalisés précédemment<sup>314</sup> en adaptant le phénomène de vapeur diffusion pour que l'auto-assemblage de GbLFY-SAM puisse avoir lieu directement sur les grilles de microscopie (Figure 2.2). La méthode utilisée ici est celle de la goutte assise. Ce dispositif permet une lente association des protéines par une différence de concentration en agent précipitant (ici le sel d'ammonium) entre la goutte et le réservoir. Ceci provoque une diffusion de vapeur d'eau de la goutte vers le réservoir afin de se rapprocher au maximum d'un équilibre dans lequel la concentration en agent précipitant est la même dans la goutte et dans le réservoir.

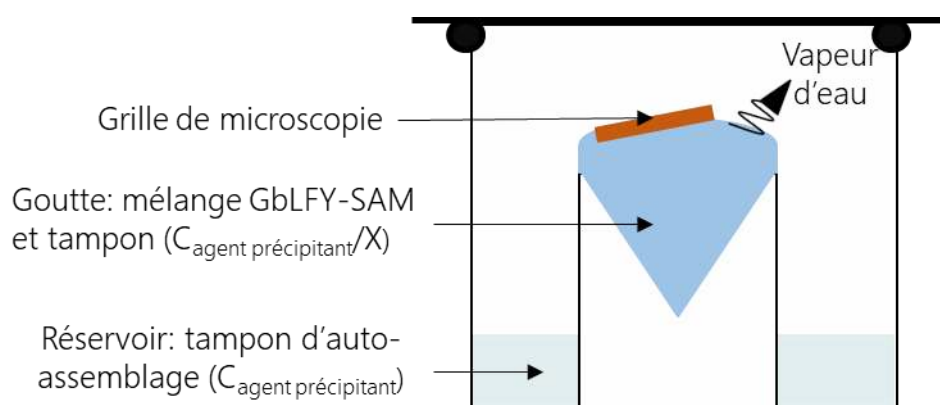


Figure 2.2 : Adaptation du principe de vapeur diffusion pour que GbLFY-SAM puisse s'auto-assembler sur la grille de microscopie. La chambre est fermée hermétiquement pour que la diffusion de vapeur puisse se faire. Le X correspond au ratio  $\frac{V_{\text{total de la goutte}}}{V_{\text{tampon d'auto-assemblage}}}$ .

Nous avons montré que la reproduction de ces conditions d'auto-assemblage permet d'obtenir la formation de cristaux parallèles à la surface. Le changement d'orientation s'obtient alors en additionnant un tag histidine à GbLFY-SAM à l'extrémité N- terminale de la séquence.

L'utilisation de l'auto-assemblage GbLFY-SAM en tant que biomatériau pour des applications en nanotechnologie repose sur deux grandes idées. Premièrement, la nature protéique des auto-assemblages en nid d'abeille les rend facilement fonctionnalisables<sup>316</sup>. Deuxièmement, du fait de l'oligomérisation de GbLFY-SAM, il est théoriquement possible d'obtenir des auto-assemblages

sur surface qui peuvent atteindre une épaisseur de quelque 100  $\mu\text{m}$  (Figure 2.1). De telles structures poreuses présentent alors des potentialités de greffage encore jamais décrites dans la littérature et dont l'utilisation pourrait convenir aux biocapteurs ou applications associées à l'énergie. Il a donc été important de déterminer la hauteur que présentaient les auto-assemblages sur surface. L'analyse par l'AFM a montré que les auto-assemblages ont une hauteur régulière de 31 nm soit environ 40 protéines empilées par pore. De plus, les parties N- et C- terminales sont situées à l'intérieur des pores de l'auto-assemblage. Nous nous sommes demandé si leur modification entraînerait une modification au niveau de l'auto-assemblage de GbLFY-SAM. Par exemple, nous avons muté un seul acide aminé, raccourci une de ces parties et même remplacé celle-ci par une séquence en acide aminé différente. Malgré la tendance des protéines mutantes à fortement oligomériser lors de leur purification les rendant insolubles, nous avons montré qu'il était possible d'obtenir des auto-assemblages présentant la structure caractéristique en nid d'abeille. Ces mutations n'exercent aucune influence sur la hauteur des auto-assemblages obtenus. En effet, cette hauteur est corrélée à l'empilement des protéines qui est médié par les interactions tête-queue qui ont lieu au niveau du cœur de la protéine. Les parties N- et C-terminale n'étant pas impliquées dans ces interactions et se trouvant à l'intérieur des pores, il est cohérent que leur modification n'ait pas d'influence sur la hauteur des auto-assemblages.

Le dernier point de cet article concerne la preuve de concept de la fonctionnalisation des auto-assemblages de GbLFY-SAM. Le tag histidines en N- terminale de GbLFY-SAM permettant l'ancrage perpendiculaire est situé à l'intérieur des pores de l'auto-assemblage, et est composé, entre autres, de 6 histidines. Ici, nous avons tiré avantage du fait que les histidines sont des acides aminés capables d'interagir avec les ions nickel<sup>317</sup>. Bien qu'il y ait d'autres histidines dans la séquence en acide aminé de GbLFY-SAM, chaque pore d'un auto-assemblage est composé d'environ 40 protéines empilées, le nombre d'histidines à l'intérieur sera de ce fait plus important. Cela devrait permettre de diriger spécifiquement les ions  $\text{Ni}^{2+}$  à l'intérieur des pores. Le résultat de ces expériences montre que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  sont spécifiquement chélatés à l'intérieur des pores et qu'il est possible de les réduire en nanoparticules sans que les auto-assemblages soient détruits. Afin de nous assurer que cette fonctionnalisation spécifique est due à l'affinité entre les ions  $\text{Ni}^{2+}$  et les histidines, nous avons testé la fonctionnalisation des auto-assemblages par les ions  $\text{Au}^{3+}$ . Ces ions métalliques n'ont pas d'affinité plus particulière pour les histidines ni pour d'autres acides aminés spécifiques présents dans la séquence de GbLFY-SAM. Ainsi, ils devraient se chélater au niveau des premiers acides aminés rencontrés par simple effet d'adsorption. Nous avons ainsi montré que la chélation des ions  $\text{Au}^{3+}$  se fait de manière préférentielle en surface de l'auto-assemblage, au niveau du contour des pores de l'auto-assemblage.

### 2.1.2 Article

# Self-Assembly of a Ginkgo Oligomerization Domain Creates a Sub-10-nm Honeycomb Architecture on Carbon and Silicon Surfaces with Customizable Pores: Implications for Nanoelectronics, Biosensing, and Biocatalysis

Elise Jacquier, Pierre-Henri Jouneau, Denis Falconet, Denis Mariolle, Emmanuel Thévenon, Grégory Si Larbi, Raluca Tiron, François Parcy,\* Pierre-Henri Elchinger,\* and Renaud Dumas\*

Cite This: *ACS Appl. Nano Mater.* 2021, 4, 9518–9526

Read Online

ACCESS |

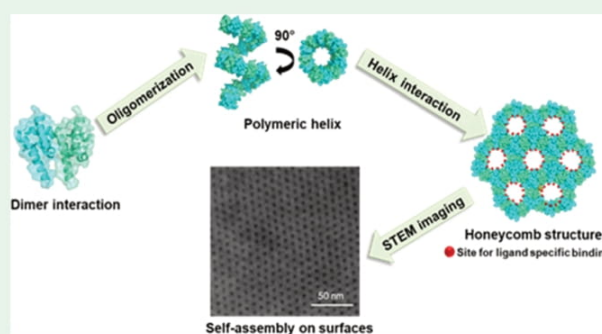
Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** Over the last decade, protein self-assembly techniques have been extensively studied and improved, enabling the production of a wide range of different nanometric patterns. However, most studies in this field depict thin self-assemblies of a few nanometers in height, while precise grafting of molecules on the patterns remains challenging. We present here a natural polymeric honeycomb organization based on the self-assembly abilities of a *Ginkgo biloba* protein oligomerization domain. This honeycomb architecture depicts 3D pores of 5 nm diameter and a height of 40 stacked proteins. Each protein has tunable N- and C-terminal extensions located inside the pore, allowing different bindings of ligands in the pore. The proof of concept is illustrated here by the distinctive metallization of the pores with nickel or gold. Overall, these characteristics make this honeycomb a versatile platform, paving the way for major biotechnological advances that were not possible with current nanomaterials.

**KEYWORDS:** helical polymer, tunable pore, nanomaterial, protein nanostructure, nanopatterning, green technology



## 1. INTRODUCTION

Nanopatterning of surfaces using biological macromolecules such as DNA, peptides, and proteins has become a highly active field of research yielding many technological breakthroughs. Due to their self-assembling ability, biological macromolecules have been widely used as a scaffold for the construction of nanomaterials.<sup>1–4</sup> Among these macromolecules, proteins with their 20 different amino acids offer flexibility in self-assembled structures with nanometric specifications. The initial objective in protein self-assembly was to obtain regular, robust, and wide two-dimensional (2D) layers with controlled height and organization. Nowadays, these protein lattices are studied to evaluate their usefulness for nanotechnological applications.

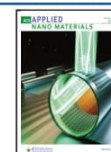
Over the years, different types of bottom-up processes have been implemented to generate protein self-assemblies on surfaces (Table S1). Pioneering work began with self-assembly of T-layer<sup>5</sup> and S-layer<sup>6</sup> proteins,<sup>7–9</sup> which are still used as biomaterials.<sup>9,10</sup> So far, the creation of self-assembled 2D protein networks for nanotechnological applications has been achieved mainly through the design and engineering of protein interfaces from known three-dimensional (3D) crystallographic structures (Table S1), with new interfaces created by different

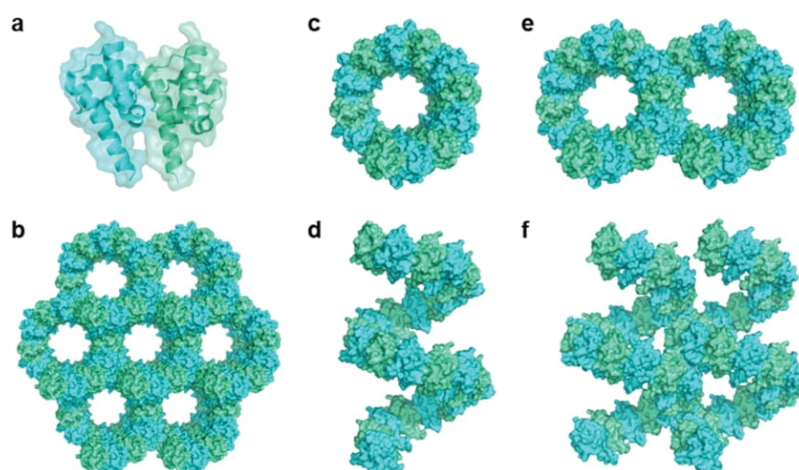
types of interactions, such as disulfide bridge,<sup>11–15</sup> metal-induced interactions,<sup>14–21</sup> hydrophobic interactions,<sup>15,22,23</sup> and the addition of fused amyloid domains.<sup>24</sup> Complex processes have also been used to tune protein networks based on ligand–receptor models,<sup>25–27</sup> streptavidin–Streptag affinity,<sup>28</sup> or covalent coupling by enzymatic catalysis.<sup>29</sup> Finally, promising de novo approaches have also been used to predict and generate different protein/protein<sup>30,31</sup> and protein/inorganic surface interfaces<sup>32</sup> for tunable protein self-assemblies.

Overall, current studies have shown that self-assembly of proteins on surfaces allows the creation of mesoporous nanomaterials with different pore shapes and sizes. These self-assembled pores can be used as grafting sites for nanotechnology applications.<sup>13,29</sup> However, most current self-assemblies do not offer the possibility to modulate both the

Received: July 15, 2021

Published: September 9, 2021





**Figure 1.** Polymeric honeycomb structure of the SAM oligomerization domain of the GbLFY protein mediated through head–tail interactions. (a) GbLFY-SAM asymmetric unit (PDB: 4UDE) showing the interaction of two monomers. (b) Each helical polymer interacts with six neighbors leading to the honeycomb architecture. Each helical polymer has a 5 nm pore, and the distance between two neighboring pores is 8 nm. (c) and (d) Details of one helical polymer. (e) and (f) Interactions between two helical polymers. In the (b–f) schemes, only 22 monomers are shown for each helix (instead of 40 determined by AFM).

type and number of grafting sites, which depend on (i) the amino acid sequence and (ii) the number of protein blocks composing the pore, often limited to a small number (4–6) of monomers.

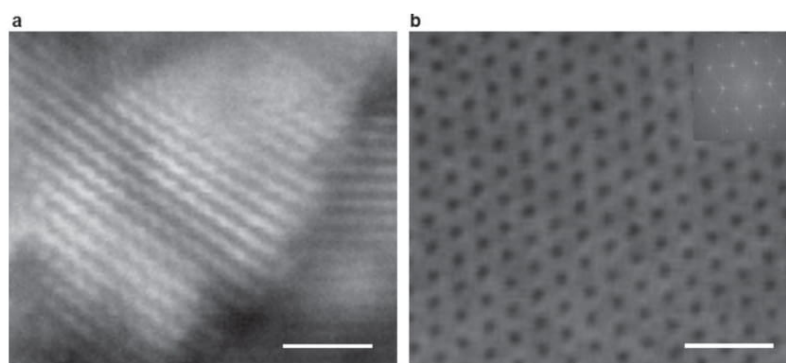
Here, to overcome this challenge, we propose to use the sterile alpha motif (SAM) domain of the LEAFY (LFY) protein from the *Ginkgo biloba* (GbLFY) tree. In nature, the LFY protein is a transcription factor, studied for its role in controlling plant meristem division, differentiation, and flower development.<sup>33,34</sup> The SAM domain of GbLFY (GbLFY-SAM) self-assembles to form a helical polymer through head–tail interactions. This polymer interlocks with six others leading to a honeycomb structure with an 8 nm pitch (distance between two neighboring pores) (Figure 1). Each helical polymer has a 5 nm pore (Figure 1) in which a disordered and modular C-terminal extension of each monomer is located. In solution, self-assembly leads to exceptionally robust micrometer hexagonal crystals that can be functionalized inside the pore.<sup>33,35</sup> The robustness of the honeycomb relies on the tight interaction between the edge of each helical polymer and the groove of its six neighbors (Figure 1). Whether this 3D modular honeycomb architecture can occur on surfaces has remained elusive. In this paper, we have successfully formed a honeycomb on different surfaces, thanks to the addition of an N-terminal extension. Each helical polymer of the honeycomb is built by about 40 stacked functionalizable proteins. Moreover, the pore lumen of each helical polymer can be modified by N- or C-terminal extension modifications without affecting the self-assembly. The concept of specific grafting into the honeycomb pores is illustrated here by differential metallization of the pores with nickel or gold.

## 2. METHODS

**2.1. Protein Synthesis and Purification.** GbLFY-SAM is composed of an 87-amino-acid core SAM oligomerization domain surrounded by 24 N- and 23 C-terminal residues. The N-terminal extension contains a six-histidine tag used for affinity purification and a cleavage site, whereas the C-terminal extension contains a disordered sequence. These residues remain invisible in the X-ray crystallography images (Figure 1) because of their flexible structure, but their presence was confirmed by mass spectrometry.<sup>35</sup> GbLFY-

SAM proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) strain. First, cells were transformed with pETM11 plasmid coding for an N-terminal histidine tag and a tobacco etch virus protease cleavage site for the N-terminal extension (referred as TEV) followed by the sequence corresponding to GbLFY-SAM wild type protein.<sup>33</sup> The transformed cells were used to inoculate 1 L of Luria-Bertani (LB) medium supplemented with 1 mL of kanamycin at 50 mg mL<sup>-1</sup> and 1 mL of chloramphenicol at 34 mg mL<sup>-1</sup>. Cells were grown at 37 °C under agitation up to an optical density of 0.6 at 600 nm. Temperature is then shifted to 18 °C for 1 h. Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (0.4 mM) is added to the culture, and growth continues at 18 °C overnight before cell pelleting. Pellets corresponding to 0.25 L of culture are sonicated in 50 mL of buffer A (20 mM Tris–HCl pH 8.0; 1 mM TCEP) supplemented with one protease inhibitor tablet (ThermoFischer). After centrifugation (45 min at 15,000g), the supernatant is loaded on an Ni-Sepharose high-performance column pre-equilibrated in buffer A. The column is then washed with buffer A containing 20 mM imidazole, and proteins are eluted with buffer A containing 300 mM imidazole. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis was performed to evaluate elution fraction purities. Then, eluted fractions were dialyzed overnight against buffer A and concentrated using Amicon Ultra centrifugal filters (Merck) until 5 mg mL<sup>-1</sup>. Proteins were then flash frozen and stored at –80 °C.

Cysteine mutant K110C, GGSGGSCHCHCHC mutant, and shorter C-terminal extensions were obtained by gene synthesis (ShineGene) from the initial GbLFY-SAM sequence cloned in pETM11.<sup>33</sup> For the shorter N-terminal extension mutants, the nucleotide sequence corresponding to seven (MHHHHHH) or the first nine (MKHHHHHHP) amino acids of the pETM11 tag was inserted in the 5' side of the sequence of GbLFY-SAM in a pET-30a (+) plasmid. The main problem with mutants modified on their N-terminal or C-terminal extension is that their ability to oligomerize via head–tail interactions has been increased, leading to the aggregation of large oligomers. To solve this problem during purifications, mutated proteins are purified in buffers containing 40–200 mM CAPS-NaOH pH 10.5 in the presence of 50–500 mM NaCl and 1 mM TCEP. The proteins are then dialyzed in a 40 mM CAPS-NaOH pH 10.5 buffer containing 50 mM NaCl and 1 mM TCEP before being used to form self-assemblies. Shorter protein without His-tag was obtained by cleavage overnight with the TEV protease (5% w/w), and the cleaved protein was purified on an Ni-Sepharose high-performance column.<sup>33</sup> The amino acid sequences of the different proteins used in this work are described in Table S2.



**Figure 2.** Orientation of the GbLFY-SAM honeycomb depends on the N-terminal extension. (a) Self-assembly of the GbLFY-SAM domain without an N-terminal extension. (b) Self-assembly of the GbLFY-SAM domain with an N-terminal extension. Each black dot corresponds to a pore of the self-assembly. The Fast Fourier Transform image shown in the inset indicates that GbLFY-SAM with the N-terminal extension forms an architecture (8 nm pitch and 5 nm lumen diameter) similar to the ones measured in the X-ray crystal structure of the GbLFY-SAM crystallized in solution<sup>33</sup> without the N-terminal extension. The self-assembly on surfaces uses the same mechanism as 3D crystals. A double mutant (one mutation in the head face and another one in the tail face) is not able to create the honeycomb structure. The scale bars are 30 nm for both images.

**2.2. Self-Assembly onto TEM Grids.** To perform protein self-assembly, a vapor diffusion sitting drop method was used. An 18  $\mu\text{L}$  drop composed of GbLFY-SAM solution and crystallization buffer is deposited in a well chamber, while the reservoir chamber contains only buffer crystallization. Optimum conditions were obtained by mixing 6  $\mu\text{L}$  of a 2.5  $\text{mg mL}^{-1}$  GbLFY-SAM solution with 12  $\mu\text{L}$  of the reservoir solution containing 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM TCEP, and 315 mM ammonium sulfate. A 200-mesh gold TEM grid coated with a pure carbon film (TED Pella) or  $\text{SiO}_2$  grid (SIMPore) was hydrophilized using a plasma glow discharge (Cordouan Technologies) at 2 mA for 40 s under  $2 \times 10^{-1}$  mbar and then put on the top of the drop. For the experiments with an SiN grid (TED Pella) either hydrophilic (coated with hydroxylated alumina) or hydrophobic (coated with alumina and fluoro-methyl-silane), no glow discharge was performed. After closing of the crystallization chamber, self-assemblies were allowed to grow at 20  $^\circ\text{C}$  for 24 h. The same protocol was used for experiments with a shorter N- or C-terminal extension.

**2.3. Negative Staining for STEM Experiments.** After 24 h crystallization, the grid is incubated with an 18  $\mu\text{L}$  drop of 2% uranyl acetate for 2 min. Liquid excess was then removed by capillarity with a filter paper, and the grid was air-dried. Self-assemblies were imaged with STEM mode using a Zeiss Merlin microscope. Images were collected using both bright field and dark field detectors at 30 kV with a beam current of 240 pA with magnification between 2 and 135 KX.

**2.4. Metallization and Chemical Analysis of the Self-Assembly.** After 24 h crystallization, the grid is incubated with an 18  $\mu\text{L}$  drop of  $\text{Ni}^{2+}$  salt (Hampton Research) or gold salt (Sigma-Aldrich). For nickel salt ( $\text{NiCl}_2$ ), a range of concentration from 0.18 mM (i.e., 10 equivalents relative to protein amount) to 1.79 mM (i.e., 100 equivalents relative to protein amount) was tested. In the same way, a range from 0.23 mM (i.e., 10 equivalents relative to protein amount) to 2.30 mM (i.e., 100 equivalents relative to protein amount) of gold salt ( $\text{HAuCl}_4$ ) has been investigated. Moreover, time incubation from 2 to 10 min has been considered. The optimal conditions are 0.53 mM (i.e., 30 equivalents relative to protein amount) for nickel salt and 0.23 mM for gold salt with an incubation time of 5 min in both cases. Then, for the reduction step, an 18  $\mu\text{L}$  drop of  $\text{NaBH}_4$  at a final concentration of 32 mM was made, and the grid was put on top of this drop, allowing reduction to occur for 5 min. Liquid excess was then removed by capillarity with a filter paper, and the grid was air-dried. STEM images were collected in the same microscope rather than the negative staining experiments at 30 kV but using only a dark field detector. The energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) spectrum of the metallized sample was acquired with an FEI Osiris microscope operated at 200 kV using a Super X Detector (Bruker).

**2.5. Atomic Force Microscopy (AFM) Imaging.** For AFM experiments, self-assemblies were imaged directly on the TEM grid or

silicon wafer using PeakForce Tapping mode in air with ScanAsyst Air probes (Bruker) using a Dimension XR AFM (Bruker). The ScanAsyst Air probes used in all the experiments have a spring constant of 0.25 N/m. Images were collected with a resolution of 1024 lines and a scan rate between 0.5 and 0.2 Hz. Scan analysis was performed using Gwyddion software (<http://gwyddion.net>). Scans were base flattened, and zero was fixed before height measurements using the profile tool. Then, an adjusting function is fitted on each self-assembly profile to extract its height. Average height ( $H_n$ ) was determined by measuring individual heights ( $H_i$ ) of at least 30 self-assemblies ( $n_i$ ) as in eq 1. Standard deviation ( $\sigma_n$ ) is determined using eq 2.

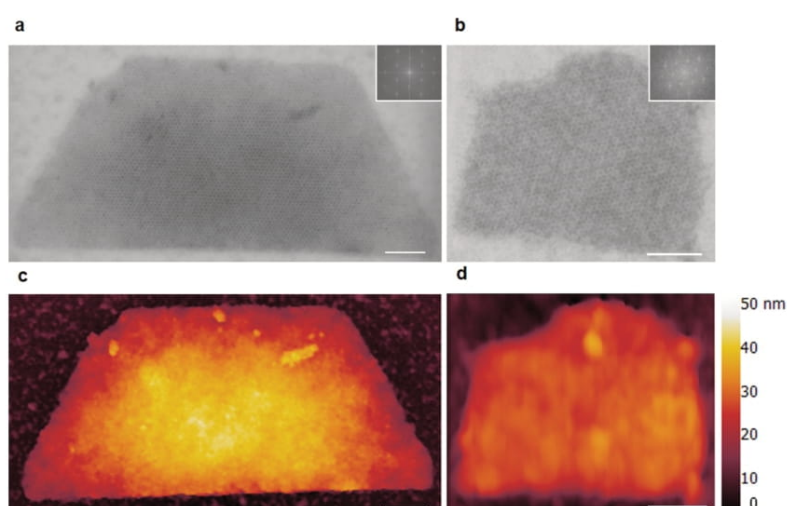
$$H_n = \frac{\sum_{i=1}^n n_i H_i}{\sum_{i=1}^n n_i} \quad (1)$$

$$\sigma_n = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (H_i - H_n)^2}{n}} \quad (2)$$

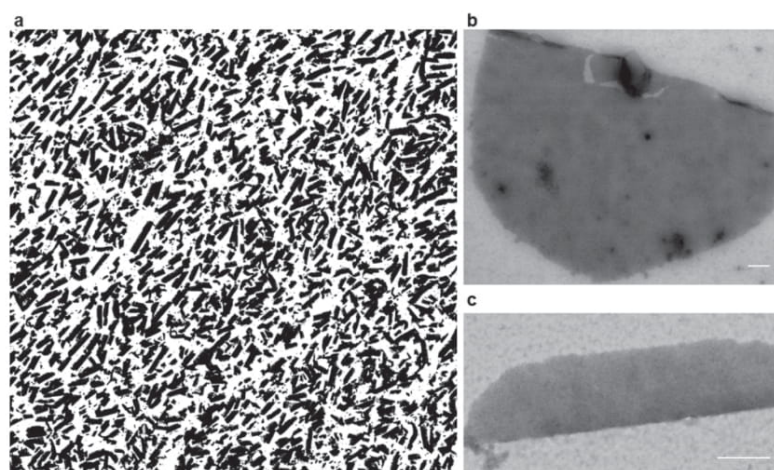
**2.6. Image Analyses.** Thanks to Fiji software (<http://imagej.net/Fiji>), STEM image contrast was enhanced by removing the background through background subtraction. Surface analysis was performed by applying a threshold on the image; then, particle analysis was performed to determine the overall coverage of the self-assemblies. To detect the self-assembly pores, a threshold and a Mexican Hat Filter were used to reduce noise in the images. The number of pores detected was counted by finding the maximal edges on the image. Lattice parameters of the self-assemblies were measured using the Fast Fourier Transform calculation. This analysis yields the power spectrum of the STEM images, whereby each frequency is associated with the angle and radii related to the lattice parameters of the self-assemblies.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

**3.1. Orientation of the Honeycomb on a Carbon Surface.** GbLFY-SAM honeycomb oligomerization has been previously observed to form 3D crystals.<sup>33</sup> It is a head-tail interaction involving mainly ionic and hydrogen bonds, as determined using mutations affecting either the head or the tail side.<sup>33</sup> Based on the same crystallographic method, we aimed to reproduce the GbLFY-SAM honeycomb self-assembly on a surface. We opted for a carbon grid surface that facilitates the characterization of protein assemblies by scanning transmission electron microscopy (STEM) after negative staining.<sup>33</sup> During the first attempts, the cleaved GbLFY-SAM domain,<sup>33</sup> devoid of its N-terminal extension, formed supramolecular helices



**Figure 3.** N-terminal extension of GbLFY-SAM can be reduced to six-histidine residues. (a) STEM image of the GbLFY-SAM with an N-terminal extension. (b) STEM image of the GbLFY-SAM with an N-terminal extension corresponding to the first nine amino acids containing the first six-histidine residues. A similar organization was obtained with a shorter N-terminal extension containing only the N-terminal methionine and six-histidine residues. (c) Height of the self-assembly shown in (a) using AFM. (d) Height of the self-assembly shown in (b) measured using AFM. Fourier transform calculations show that the GbLFY-SAM with its N-terminal extension and the mutant with a shorter N-terminal extension disclose similar lattice parameters. AFM measurements indicate that both self-assemblies have an average height of 31 nm. The scale bars are 200 nm for all four images.



**Figure 4.** Surfaces covered by GbLFY-SAM with its N-terminal extension after carbon grid treatment using glow discharge. (a) Use of a threshold in ImageJ to detect self-assemblies on STEM images reveals a cover up to 54% of the carbon surface. This image is a  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$  area. (b) and (c) Surface of individual self-assemblies varies from (c)  $0.3 \mu\text{m}^2$  to (b)  $4.9 \mu\text{m}^2$ . The scale bars are 200 nm for all the images.

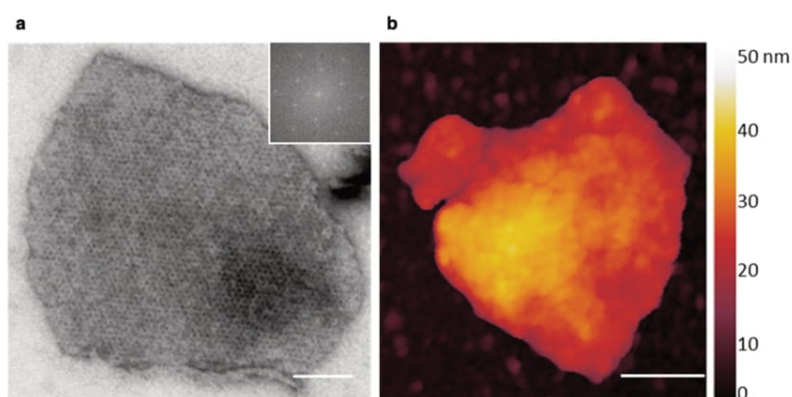
lying parallel to the surface grid without forming an apparent honeycomb (Figure 2 and Figure S1).

To determine whether the N-terminal extension initially present on the protein could play a role in the orientation of the self-assembly, we repeated the experiments with the uncleaved protein. STEM images of the self-assembly of GbLFY-SAM with its N-terminal extension revealed black dots corresponding to the pores of the honeycomb oriented perpendicular to the carbon grid (Figure 2, Figure 3, and Figure S1). To further check whether residual  $\text{Ni}^{2+}$  from the Ni-NTA column was not responsible for the self-assembly by promoting interaction between the N-terminal extensions (e.g., the histidine tag), we performed the same experiment in the presence of EDTA, an  $\text{Ni}^{2+}$  chelator. The STEM images (Figure S2) showed that the honeycomb architecture was not

affected by EDTA, supporting the absence of nickel effect on the self-assembly.

Since the N-terminal extension was not present in the X-ray structure of the 3D crystals growing in solution,<sup>33</sup> we used the I-TASSER modeling server<sup>36</sup> to elucidate its position (Figure S3). Based on this model, the N-terminal extension of each monomer is not found in the same pore as the C-terminal extension but in an adjacent pore (Figure S3). However, in the honeycomb, both N- and C-terminal extensions are located within the pores (Figure S3).

Next, we determined which part of the 23 amino acids of the N-terminal extension was key for perpendicular honeycomb orientation. By successively deleting the amino acids of the N-terminal extension starting from the ones closest to the GbLFY-SAM core, we established that the first six-histidine residues are sufficient for this orientation (Figure 3 and Figure



**Figure 5.** Self-assembly of GbLFY-SAM with its N-terminal extension on the silicon surface. (a) STEM image of the self-assembly on a silicon grid. The Fourier transform image shown in the inset indicates dimensions similar to those observed on the carbon surface. (b) Height of a GbLFY-SAM self-assembly on a silicon wafer measured using AFM. The scale bars are 100 nm for both images.

S4). The presence of the N-terminal extension likely allows interaction with the grid and perpendicular growth of the honeycomb. Alternatively, the absence of the N-terminal extension could induce a large formation of 3D crystals in solution, depleting the protein available for surface crystallization.

**3.2. Characterization of the Honeycomb Growth on Carbon and Silicon Surfaces.** Self-assembly of molecules onto surfaces often leads to miss folding or defects in the lattice.<sup>37</sup> Here, Fast Fourier Transform (FFT) calculations, performed using STEM images of the GbLFY-SAM honeycomb array, reveal lattice parameters ( $a = b = 8.2$  ( $\pm 0.1$ ) nm and  $\gamma = 120$  ( $\pm 1$ ) $^\circ$ ) identical to those found on the crystal by X-ray diffraction<sup>33</sup> (Figures 2 and 3; Figures S1, S2, and S4).

In solution, the head–tail interactions extend to several monomers to create helical oligomers of a limited sized of about 8 monomers at a protein concentration of 4.5 mg/mL as demonstrated by size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering experiments.<sup>33</sup> Under crystallization conditions, the helices can grow to larger sizes and each helix interacts with six other helices to form a honeycomb structure.<sup>33</sup> The 3D crystals can reach 500  $\mu\text{m}$  in length and 50  $\mu\text{m}$  in width. However, the self-assemblies grown on the carbon grid are thinner. Correlative microscopy between STEM and AFM was performed, and the AFM (Figure 3) measurements indicated a height of 31 ( $\pm 5$ ) nm, corresponding to a stacking of around 40 oligomerization domains (Figure 3 and Figure S5). We also determined that the height of the shorter N-terminal mutant is similar to that of GbLFY-SAM (Figure 3). Overall, the protein honeycomb covers around 10% of the grid, with individual crystals of up to 0.3  $\mu\text{m}^2$ .

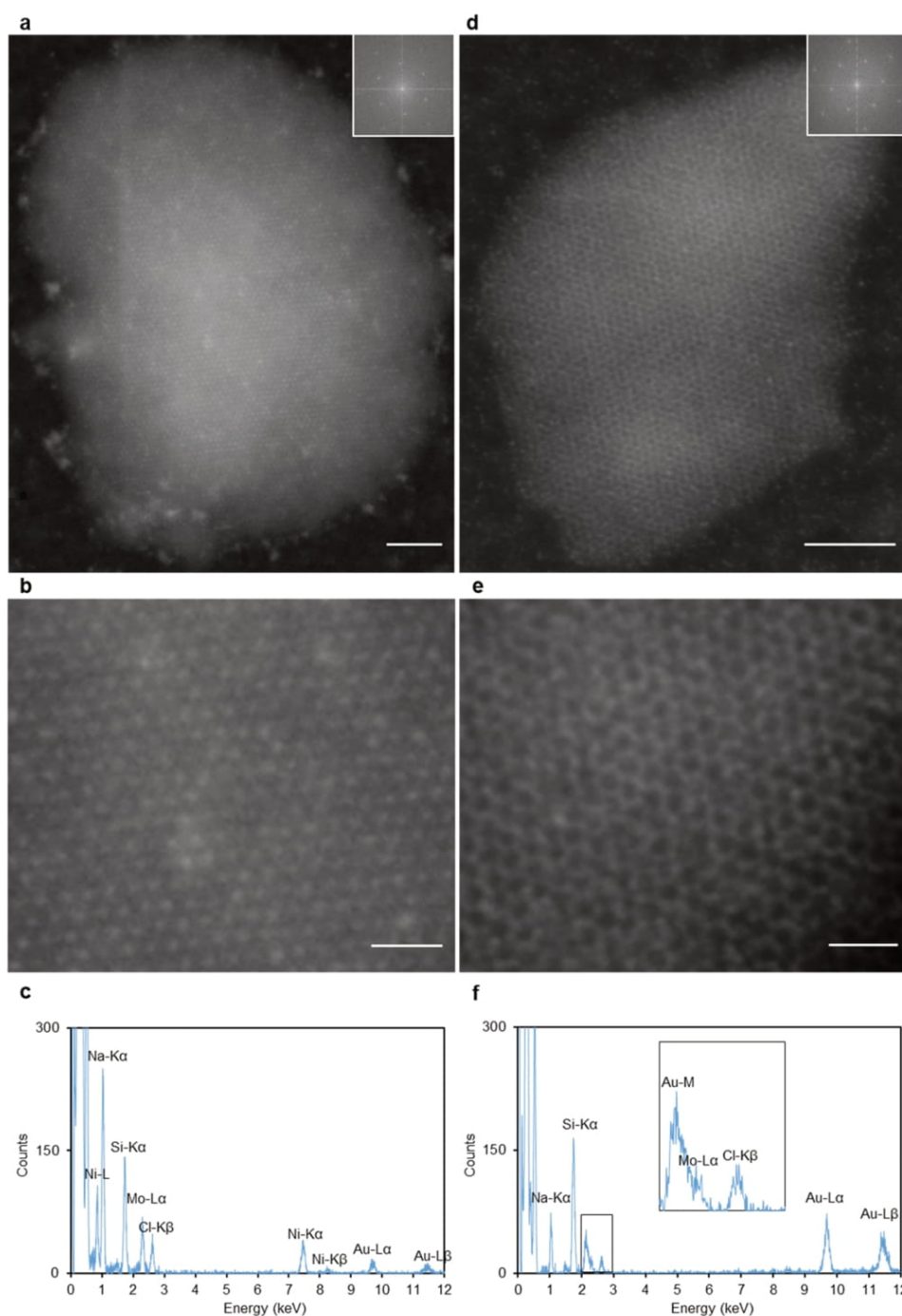
For nanotechnological applications, large-scale nanopatterning is required.<sup>38</sup> Moreover, amorphous carbon used to coat the EM grid is not a suitable substrate for these applications as it does not conduct electrons. In order to overcome these limitations, we adjusted our protocol. First, we attempted to increase the surface covered by the self-assembly, by glow discharging the grids to hydrophilize them. The total area covered by the honeycomb increased by up to 54%, with an individual self-assembly surface of up to 4.9  $\mu\text{m}^2$  (Figure 4). These observations suggest that the honeycomb binds on the grid surfaces through weak polar interactions. Regardless of the protein concentration (0.625 to 2.5 mg mL<sup>-1</sup>), a mixture of

shapes is obtained of which the trapezium (Figure 3a) and its elongated form (Figure 4c) in one dimension are the most representative.

Then, we changed the carbon substrate to silicon wafers widely used in nanoelectronic applications. We succeeded in reproducing such assemblies on silicon grids and wafers and obtained a similar honeycomb architecture as revealed by STEM (Figure 5a). It is noteworthy that the change in the surface (silicon wafer or carbon grid) affects neither the height of the GbLFY-SAM lattice (Figure 5b) nor the lattice parameters. To further investigate the influence of the surface properties on the self-assembly, we also tried hydrophilic and hydrophobic commercial silicon nitride grids (Figure S6). These grids are coated respectively with hydroxylated alumina and alumina plus fluoro-methyl-silane. There is no difference between the hydrophilic and the hydrophobic coating on the GbLFY-SAM self-assembly. In addition, the lattice parameters are also the same as the ones on carbon and silicon surfaces. Altogether, these results show that self-assembly can take place on a wide variety on surfaces.

### 3.3. Polymeric Honeycomb Structure Metallization.

Finally, one of the key points for the use of the protein self-assemblies in the field of nanotechnology is the functionalization of the pores. To this end, we investigated whether it was possible to selectively metallize the polymeric honeycomb structure. As the N-terminal extension is composed of at least six-histidine and faces the inside of the lattice pores, we aimed at using the specific affinity of histidine for Ni<sup>2+</sup> to metallize the pores of the self-assembly (Figure S3). After the crystallization of the GbLFY-SAM self-assembly on the TEM grid, Ni<sup>2+</sup> salt was added onto the self-assembly for 5 min. Then, NaBH<sub>4</sub> was used to reduce Ni<sup>2+</sup> salt. It is noteworthy that in this experiment, nickel was the only element allowing the staining of the self-assembly in STEM. As expected, metallization of the GbLFY-SAM honeycomb with Ni<sup>2+</sup> salt reduction occurs inside the pores demonstrating that the N-terminal extension of GbLFY-SAM is inside the lattice pores (Figure 6a) as previously modeled. To fully characterize the metallized honeycomb, we also acquired an electron-dispersive X-ray spectroscopy spectrum of the self-assembly corroborating the presence of nickel (Figure 6a). Thus, despite the reduction of nickel by NaBH<sub>4</sub>, the honeycomb structure remains intact, and FFT calculations of the STEM images showed lattice parameters similar to those measured in STEM images of the negative stained GbLFY-SAM self-assembly.



**Figure 6.** Specific metallization of the self-assembly with (a–c) Ni<sup>2+</sup> salt or (d–f) Au<sup>3+</sup> salt. In these images, the contrast is only provided by the reduced metal. (a) STEM image in dark field mode of a self-assembly with Ni<sup>2+</sup> salt reduced by NaBH<sub>4</sub> inside the pore. (b) Zoomed-in STEM image. Scale bar: 30 nm. (c) EDX spectrum of the self-assembly emphasizing the presence of nickel. (d) STEM image in dark field mode of a self-assembly with Au<sup>3+</sup> salt reduced by NaBH<sub>4</sub> outside of the pore. (e) Zoomed-in STEM image. Scale bar: 30 nm. (f) EDX spectrum of the self-assembly emphasizing the presence of gold. The inset shows zoomed-in pictures from 2 to 3 keV to illustrate the overlapping between Au–M and Mo–Lα. The scale bars are 100 nm for both images.

Then, we performed these experiments in the presence of 1 mM EDTA before the salt reduction to check the specific effect of Ni<sup>2+</sup>. We showed that the chelation of Ni<sup>2+</sup> by EDTA can block the metallization of the self-assembly, which appears unstained in STEM with no characteristic nickel X-ray in the related EDX spectrum (Figure S7). From these results, it appears that a specific metallization of the pores of the

honeycomb lattice is achievable using the advantageous affinity of a metal for amino acid located inside the pores.

To further investigate this point, we metallized the honeycomb structure with another metal showing different binding properties. The affinity of gold salt for amino acid has been studied previously<sup>39</sup> showing rather broader interactions and different affinities than Ni<sup>2+</sup> for histidine.

As expected, the in situ reduction of gold salt in the self-assembly does not lead to a specific staining of the inner part of the pores but to the coloration of their outlines (Figure 6b). This labeling is explained by a higher number of amino acids able to interact with gold in the core oligomerization domain compared to the N- and C-terminal extensions. As in the nickel experiments, gold was the only element allowing the staining of the self-assembly in STEM. The presence of gold on the self-assembly was confirmed by acquiring an EDX spectrum (Figure 6b). These results demonstrated that the honeycomb structure can be metallized either inside or outside of the pore depending on the specific affinity of the amino acid present in the pore for metal salt.

**3.4. Honeycomb Lattice Engineering for Future Nanotechnological Applications.** Metallization of the GbLFY-SAM can be specifically driven inside the honeycomb pores, thanks to the affinity of the N-terminal extension histidines for a metal such as Ni<sup>2+</sup>. In addition, it has been shown that the C-terminal extension of GbLFY-SAM also faces the inside of the pore.<sup>35</sup> We investigated if it was possible to modify the amino acids of the C-terminal extension without affecting the oligomerization capacity of the monomer and the honeycomb structure. We aimed to explore a modification of GbLFY-SAM involving a complete deletion of its C-terminal extension. This modification had an impact on the solubility and stability of the GbLFY-SAM in solution. The deletion of the C-terminal extension makes GbLFY-SAM oligomerization faster and leads to protein precipitation in the classic purification protocol. Nevertheless, after optimization of the purification and surface crystallization protocols, we obtained honeycomb self-assemblies identical to those of GbLFY-SAM (Figure S4b).

We also made other C-terminal constructions to emphasize the versatility of the GbLFY-SAM self-assembly. In the first construction, we mutated a lysine into a cysteine residue (GbLFY-SAM K110C) (Figure S4c) in order to insert a unique cysteine residue for specific grafting. In the second construction, we deleted all the C-terminal part and replaced it by the amino acid sequence GGSGGSCHCHCHC (Figure S4d) containing a linker and three histidine and cysteine residues for specific grafting. For these two mutants, the modification has no impact either on the honeycomb formation or on the lattice parameters.

Thus, both the N- and C-terminal extensions of GbLFY-SAM can be modified without affecting the honeycomb self-assembly ability. Engineering these extensions by inserting amino acid residues or sequences capable of reacting with specific organic, inorganic, or metallic compounds would make this honeycomb architecture a modular grafting platform. Moreover, this platform could accommodate a large number of grafting sites. Indeed, a surface of 1  $\mu\text{m}^2$  allows one to obtain approximately 12,000 pores. Having determined an average pore height per AFM of 31 nm corresponding to a stacking of 40 monomers, we can estimate a capacity of at least 480,000 specific grafting sites per  $\mu\text{m}^2$  (based on one grafting per monomer) (Figure S8). Selective grafting on the protein can be easily obtained, and many amino acid residues can be used<sup>40,41</sup> as demonstrated with the grafting of a ruthenium-based complex onto modified residues of the pores of 3D-GbLFY-SAM crystals in solution.<sup>35</sup> The pores of the honeycomb could hold specific grafting of catalysts and chromophores at different positions. Hence, the GbLFY-

SAM self-assembly on the surface could be easily used as a biocatalysis platform.

In addition, great efforts have been made to produce nanostructures with a sub 10 nm pitch for microelectronics applications.<sup>42</sup> Indeed, the production of masks for lithography below 10 nm remains difficult and expensive.<sup>43,44</sup> Among all the lithographic techniques, block copolymers remain one of the main technologies currently studied to overcome this challenge.<sup>45</sup> The use of the GbLFY-SAM honeycomb as a hard mask (Figure S8) represents a promising opportunity that could compete with the technology of block copolymers.<sup>46,47</sup> Combining photo-etching or chemical etching (e.g., hydrofluoric acid) with a modified GbLFY-SAM with short N- and C-terminal extensions making the honeycomb pore empty could lead to an etching of a sub 10 nm pitch motif.

Nanoelectronics is not the only field in which the 5 nm modifiable pores of GbLFY-SAM could be useful. Honeycomb pores could also be exploited to build nanopillars by grafting and stacking metallic nanoparticles or quantum dots for use in photovoltaic devices.<sup>48,49</sup> In addition, the graftable pores of GbLFY-SAM, which are almost 10 times smaller in diameter than those currently being tested, could offer an interesting opportunity to increase the photovoltaic yield.<sup>50</sup> Closely and evenly spaced metallic nanopillars would also create a dense network that could also improve the signal of biosensor devices for the detection of lower molecular concentrations.<sup>51–53</sup> Whether these 8 nm pitch arrays of 5 nm nanopillars increase efficiency or provide new properties—due specifically to quantum effects—is an open question.

## 4. CONCLUSIONS

In summary, we present here the natural self-assembly capabilities of a *Ginkgo biloba* protein oligomerization domain, building a robust honeycomb architecture with a pitch of 8 nm and 3D pores of 5 nm diameter. Our results show that the orientation of this honeycomb can be controlled on different surfaces. Furthermore, we have shown that the N- and C-terminal extensions can be modified without altering the self-assembly and that the amino acids present on these extensions can be used to specifically metallize the inside or the outside of the pores. Engineering the extensions of the oligomerization domain by inserting amino acid sequences capable of reacting with specific organic, inorganic, or metallic compounds will make this honeycomb architecture a modular grafting platform for an extensive range of applications covering biocatalysis, biosensing, or photovoltaics. Moreover, the pores formed by 40 stacked oligomerization domains lead to a huge number of grafting sites above 500,000 per  $\mu\text{m}^2$ . In addition to the specific grafting possibilities, the nanometric dimensions of the honeycomb architecture are a promising opportunity to produce masks for lithography processes that could compete with current technologies such as block copolymers.

In conclusion, the possibility of modifying the pore composition for etching or specifically grafting a large number of molecules makes this *Ginkgo* self-assembled honeycomb a new and unique green nanomaterial pioneering major biotechnological breakthroughs previously impossible with current nanomaterials.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnm.1c01944>.

Overview on protein self-assembly, amino acid sequence of N- and C-terminal extensions, superposition of GbLFY-SAM crystallographic structure on the STEM image, STEM image with EDTA, localization of the N- and C-terminal extension in the honeycomb, STEM images of engineered N- and C-terminals, AFM scan of multiple honeycombs, STEM images on hydrophilic and hydrophobic surfaces, desorption of nickel salt with EDTA, and self-assembly as a platform for specific grafting of a huge number of ligands (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

François Parcy – Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France; Email: [francois.parcy@cea.fr](mailto:francois.parcy@cea.fr)

Pierre-Henri Elchinger – Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France; Email: [pierre-henri.elchinger@cea.fr](mailto:pierre-henri.elchinger@cea.fr)

Renaud Dumas – Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France; [orcid.org/0000-0003-1404-3274](https://orcid.org/0000-0003-1404-3274); Email: [renaud.dumas@cea.fr](mailto:renaud.dumas@cea.fr)

### Authors

Elise Jacquier – Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France; Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France

Pierre-Henri Jouneau – Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France

Denis Falconet – Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France

Denis Mariolle – Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France

Emmanuel Thévenon – Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France

Grégory Si Larbi – Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France

Raluca Tiron – Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acsnm.1c01944>

### Author Contributions

E.J., R.T., F.P., P.H.E., and R.D. designed the experiments. E.J., P.H.J., D.F., D.M., E.T., G.S., P.H.E., and R.D. performed the experiments. All authors interpreted the results. E.J., P.H.E., and R.D. wrote the paper with the help of F.P. and input from all authors.

### Funding

This work was supported by a CEA program Nanoprot 3D to F.P. and R.T., a post-doctoral fellowship to P.H.E., a PhD fellowship from the CEA [E.J.], a DRF impulsion grant [to Olivier Hamelin, P.H.E., and R.D.], the LabEx Grenoble Alliance for Cell and Structural Biology [ANR-10-LABX-0049 to F.P. and R.D.], and the LabEx Arcane and CBH-EUR-GS [ANR-17-EURE-0003 to P.H.E.].

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Lucile Chiari, Olivier Hamelin, Jean-Luc Putaux, the Nanoprot 3D and A3DN work group (Didier Gasparutto, Xavier Baillin, Robert Baptiste, Caroline Fontenoye, Guillaume Nonglaton, and Pascal Mailley), Patrice Rannou, and Luc Federzoni for helpful discussions.

## REFERENCES

- (1) Thiruvengadathan, R.; Korampally, V.; Ghosh, A.; Chanda, N.; Gangopadhyay, K.; Gangopadhyay, S. Nanomaterial Processing Using Self-Assembly-Bottom-up Chemical and Biological Approaches. *Rep. Prog. Phys.* **2013**, *76*, No. 066501.
- (2) Sun, H.; Luo, Q.; Hou, C.; Liu, J. Nanostructures Based on Protein Self-Assembly: From Hierarchical Construction to Bioinspired Materials. *Nano Today* **2017**, *14*, 16–41.
- (3) Fan, S.; Wang, D.; Kenaan, A.; Cheng, J.; Cui, D.; Song, J. Create Nanoscale Patterns with DNA Origami. *Small* **2019**, *15*, No. 1805554.
- (4) Liu, R.; Hudalla, G. A. Using Self-Assembling Peptides to Integrate Biomolecules into Functional Supramolecular Biomaterials. *Molecules* **2019**, *24*, 1450.
- (5) Aebi, U.; Smith, P. R.; Dubochet, J.; Henry, C.; Kellenberger, E. A Study of the Structure of the T-Layer of *Bacillus Brevis*. *J. Supramol. Struct.* **1973**, *1*, 498–522.
- (6) Sleytr, U. B. Regular Arrays of Macromolecules on Bacterial Cell Walls: Structure, Chemistry, Assembly, and Function. In *International Review of Cytology*; Elsevier, 1978, *53*, 1–64.
- (7) Györfvay, E. S.; Stein, O.; Pum, D.; Sleytr, U. B. Self-Assembly and Recrystallization of Bacterial S-Layer Proteins at Silicon Supports Imaged in Real Time by Atomic Force Microscopy. *J. Microsc.* **2003**, *212*, 300–306.
- (8) Moll, D.; Huber, C.; Schlegel, B.; Pum, D.; Sleytr, U. B.; Sara, M. S-Layer-Streptavidin Fusion Proteins as Template for Nanopatterned Molecular Arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 14646–14651.
- (9) Baneyx, F.; Matthaei, J. F. Self-Assembled Two-Dimensional Protein Arrays in Bionanotechnology: From S-Layers to Designed Lattices. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *28*, 39–45.
- (10) Charrier, M.; Li, D.; Mann, V. R.; Yun, L.; Jani, S.; Rad, B.; Cohen, B. E.; Ashby, P. D.; Ryan, K. R.; Ajo-Franklin, C. M. Engineering the S-Layer of *Caulobacter Crescentus* as a Foundation for Stable, High-Density, 2D Living Materials. *ACS Synth. Biol.* **2019**, *8*, 181–190.
- (11) Zhou, K.; Chen, H.; Zhang, S.; Wang, Y.; Zhao, G. Disulfide-Mediated Reversible Two-Dimensional Self-Assembly of Protein Nanocages. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 7510–7513.
- (12) Nguyen, T. K.; Negishi, H.; Abe, S.; Ueno, T. Construction of Supramolecular Nanotubes from Protein Crystals. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 1046–1051.
- (13) Du, M.; Zhou, K.; Wang, X.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Dong, J.; Wu, L.; Qiao, Z.; Chen, G.; Wang, Q. Precise Fabrication of De Novo Nanoparticle Lattices on Dynamic 2D Protein Crystalline Lattices. *Nano Lett.* **2020**, *20*, 1154–1160.
- (14) Zhang, J.; Wang, X.; Zhou, K.; Chen, G.; Wang, Q. Self-Assembly of Protein Crystals with Different Crystal Structures Using Tobacco Mosaic Virus Coat Protein as a Building Block. *ACS Nano* **2018**, *12*, 1673–1679.
- (15) Suzuki, Y.; Cardone, G.; Restrepo, D.; Zavattieri, P. D.; Baker, T. S.; Tezcan, F. A. Self-Assembly of Coherently Dynamic, Auxetic, Two-Dimensional Protein Crystals. *Nature* **2016**, *533*, 369–373.
- (16) Heyman, A.; Medalsy, I.; Dgany, O.; Porath, D.; Markovich, G.; Shoseyov, O. Float and Compress: Honeycomb-like Array of a Highly Stable Protein Scaffold. *Langmuir* **2009**, *25*, 5226–5229.
- (17) Brodin, J. D.; Ambroggio, X. I.; Tang, C.; Parent, K. N.; Baker, T. S.; Tezcan, F. A. Metal-Directed, Chemically Tunable Assembly of One-, Two- and Three-Dimensional Crystalline Protein Arrays. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 375–382.
- (18) Brodin, J. D.; Carr, J. R.; Sontz, P. A.; Tezcan, F. A. Exceptionally Stable, Redox-Active Supramolecular Protein Assemblies with Emergent Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 2897–2902.
- (19) Zhang, W.; Luo, Q.; Miao, L.; Hou, C.; Bai, Y.; Dong, Z.; Xu, J.; Liu, J. Self-Assembly of Glutathione S-Transferase into Nanowires. *Nanoscale* **2012**, *4*, 5847.
- (20) Yang, M.; Song, W. J. Diverse Protein Assembly Driven by Metal and Chelating Amino Acids with Selectivity and Tunability. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5545.

- (21) Matthaei, J. F.; DiMaio, F.; Richards, J. J.; Pozzo, L. D.; Baker, D.; Baneyx, F. Designing Two-Dimensional Protein Arrays through Fusion of Multimers and Interface Mutations. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 5235–5239.
- (22) Lo, V.; Ren, Q.; Pham, C.; Morris, V.; Kwan, A.; Sunde, M. Fungal Hydrophobin Proteins Produce Self-Assembling Protein Films with Diverse Structure and Chemical Stability. *Nanomaterials* **2014**, *4*, 827–843.
- (23) Zhou, K.; Zang, J.; Chen, H.; Wang, W.; Wang, H.; Zhao, G. On-Axis Alignment of Protein Nanocage Assemblies from 2D to 3D through the Aromatic Stacking Interactions of Amino Acid Residues. *ACS Nano* **2018**, *12*, 11323–11332.
- (24) Zheng, B.; Zhou, K.; Zhang, T.; Lv, C.; Zhao, G. Designed Two- and Three-Dimensional Protein Nanocage Networks Driven by Hydrophobic Interactions Contributed by Amyloidogenic Motifs. *Nano Lett.* **2019**, *19*, 4023–4028.
- (25) Sakai, F.; Yang, G.; Weiss, M. S.; Liu, Y.; Chen, G.; Jiang, M. Protein Crystalline Frameworks with Controllable Interpenetration Directed by Dual Supramolecular Interactions. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, No. 4634.
- (26) Yang, G.; Ding, H.; Kochovski, Z.; Hu, R.; Lu, Y.; Ma, Y.; Chen, G.; Jiang, M. Highly Ordered Self-Assembly of Native Proteins into 1D, 2D, and 3D Structures Modulated by the Tether Length of Assembly-Inducing Ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10691–10695.
- (27) Liu, R.; Kochovski, Z.; Li, L.; Yin, Y.; Yang, J.; Yang, G.; Tao, G.; Xu, A.; Zhang, E.; Ding, H.; Lu, Y.; Chen, G.; Jiang, M. Fabrication of Pascal-triangle Lattice of Proteins by Inducing Ligand Strategy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 9617–9623.
- (28) Sinclair, J. C.; Davies, K. M.; Vénien-Bryan, C.; Noble, M. E. M. Generation of Protein Lattices by Fusing Proteins with Matching Rotational Symmetry. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 558–562.
- (29) Zhao, L.; Zou, H.; Zhang, H.; Sun, H.; Wang, T.; Pan, T.; Li, X.; Bai, Y.; Qiao, S.; Luo, Q.; Xu, J.; Hou, C.; Liu, J. Enzyme-Triggered Defined Protein Nanoarrays: Efficient Light-Harvesting Systems to Mimic Chloroplasts. *ACS Nano* **2017**, *11*, 938–945.
- (30) Gonen, S.; DiMaio, F.; Gonen, T.; Baker, D. Design of Ordered Two-Dimensional Arrays Mediated by Noncovalent Protein-Protein Interfaces. *Science* **2015**, *348*, 1365–1368.
- (31) Chen, Z.; Johnson, M. C.; Chen, J.; Bick, M. J.; Boyken, S. E.; Lin, B.; De Yoreo, J. J.; Kollman, J. M.; Baker, D.; DiMaio, F. Self-Assembling 2D Arrays with *de Novo* Protein Building Blocks. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 8891–8895.
- (32) Pyles, H.; Zhang, S.; De Yoreo, J. J.; Baker, D. Controlling Protein Assembly on Inorganic Crystals through Designed Protein Interfaces. *Nature* **2019**, *571*, 251–256.
- (33) Sayou, C.; Nanao, M. H.; Jamin, M.; Posé, D.; Thévenon, E.; Grégoire, L.; Tichtinsky, G.; Denay, G.; Ott, F.; Peirats Llobet, M.; Schmid, M.; Dumas, R.; Parcy, F. A SAM Oligomerization Domain Shapes the Genomic Binding Landscape of the LEAFY Transcription Factor. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11222.
- (34) Denay, G.; Chahtane, H.; Tichtinsky, G.; Parcy, F. A Flower Is Born: An Update on Arabidopsis Floral Meristem Formation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2017**, *35*, 15–22.
- (35) Chiari, L.; Carpentier, P.; kieffer-jaquinod, S.; Gogny, A.; Perard, J.; Ravanel, S.; Cobessi, D.; Menage, S.; Dumas, R.; Hamelin, O. LEAFY Protein Crystals with a Honeycomb Structure as Platform for Selective Preparation of Outstanding Stable Bio-Hybrid Materials. *Nanoscale* **2021**, *13*, 8901.
- (36) Yang, J.; Zhang, Y. I-TASSER Server: New Development for Protein Structure and Function Predictions. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W174–81.
- (37) Nagpal, U.; Müller, M.; Nealey, P. F.; de Pablo, J. J. Free Energy of Defects in Ordered Assemblies of Block Copolymer Domains. *ACS Macro Lett.* **2012**, *1*, 418–422.
- (38) Sreenivasan, S. V.; Choi, J.; Schumaker, P.; Xu, F. Status of UV Imprint Lithography for Nanoscale Manufacturing. *Compr. Nanosci. Technol.* **2011**, *4*, 83–116.
- (39) Tan, Y. N.; Lee, J. Y.; Wang, D. I. C. Uncovering the Design Rules for Peptide Synthesis of Metal Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5677–5686.
- (40) Taylor, M. T.; Nelson, J. E.; Suero, M. G.; Gaunt, M. J. A Protein Functionalization Platform Based on Selective Reactions at Methionine Residues. *Nature* **2018**, *562*, 563–568.
- (41) Gunnoo, S. B.; Madder, A. Chemical Protein Modification through Cysteine. *ChemBiochem* **2016**, *17*, 529–553.
- (42) Jung, W.-B.; Jang, S.; Cho, S.-Y.; Jeon, H.-J.; Jung, H.-T. Recent Progress in Simple and Cost-Effective Top-Down Lithography for  $\approx 10$  Nm Scale Nanopatterns: From Edge Lithography to Secondary Sputtering Lithography. *Adv. Mater.* **2020**, No. 1907101.
- (43) Hasan, R. M. M.; Luo, X. Promising Lithography Techniques for Next-Generation Logic Devices. *Nanomanuf. Metrol.* **2018**, *1*, 67–81.
- (44) Liddle, J. A.; Gallatin, G. M. Nanomanufacturing: A Perspective. *ACS Nano* **2016**, *10*, 2995–3014.
- (45) Bates, C. M.; Maher, M. J.; Janes, D. W.; Ellison, C. J.; Willson, C. G. Block Copolymer Lithography. *Macromolecules* **2014**, *47*, 2–12.
- (46) Park, S.; Lee, D. H.; Xu, J.; Kim, B.; Hong, S. W.; Jeong, U.; Xu, T.; Russell, T. P. Macroscopic 10-Terabit-per-Square-Inch Arrays from Block Copolymers with Lateral Order. *Science* **2009**, *323*, 1030–1033.
- (47) Li, Y.; Xu, Y.; Cao, S.; Zhao, Y.; Qu, T.; Iyoda, T.; Chen, A. Nanoporous Films with Sub-10 Nm in Pore Size from Acid-Cleavable Block Copolymers. *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*, No. 1600662.
- (48) Kapadia, R.; Fan, Z.; Takei, K.; Javey, A. Nanopillar Photovoltaics: Materials, Processes, and Devices. *Nano Energy* **2012**, *1*, 132–144.
- (49) Saadi, S.; Nazari, B. Recent Developments and Applications of Nanocomposites in Solar Cells: A Review. *J. Compos. Compd.* **2019**, *1*, 34–38.
- (50) Zhou, D.; Pennec, Y.; Djafari-Rouhani, B.; Cristini-Robbe, O.; Xu, T.; Lambert, Y.; Deblock, Y.; Faucher, M.; Stiévenard, D. Optimization of the Optical Properties of Nanostructured Silicon Surfaces for Solar Cell Applications. *J. Appl. Phys.* **2014**, *115*, 134304.
- (51) Oh, Y.-J.; Kang, M.; Park, M.; Jeong, K.-H. Engineering Hot Spots on Plasmonic Nanopillar Arrays for SERS: A Review. *Biochip J.* **2016**, *10*, 297–309.
- (52) Lee, K.-L.; Hung, C.-Y.; Pan, M.-Y.; Wu, T.-Y.; Yang, S.-Y.; Wei, P.-K. Dual Sensing Arrays for Surface Plasmon Resonance (SPR) and Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Based on Nanowire/Nanorod Hybrid Nanostructures. *Adv. Mater. Interfaces* **2018**, *5*, No. 1801064.
- (53) Wang, Y.; Becker, M.; Wang, L.; Liu, J.; Scholz, R.; Peng, J.; Gösele, U.; Christiansen, S.; Kim, D. H.; Steinhart, M. Nanostructured Gold Films for SERS by Block Copolymer-Templated Galvanic Displacement Reactions. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2384–2389.

## Supporting Information

Self-Assembly of a Ginkgo Oligomerization Domain Creates a Sub-10-nm Honeycomb Architecture on Carbon and Silicon Surfaces with Customizable Pores: Implications for Nanoelectronics, Biosensing and Biocatalysis

Elise Jacquier, Pierre-Henri Jouneau, Denis Falconet, Denis Mariolle, Emmanuel Thévenon, Grégory Si Larbi, Raluca Tiron, François Parcy\*, Pierre-Henri Elchinger\*, Renaud Dumas\*

### Corresponding Authors

François Parcy - Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, INRAE, IRIG-DBSCI-LPCV, 38000 Grenoble, France. Email: [francois.parcy@cea.fr](mailto:francois.parcy@cea.fr)

Pierre-Henri Elchinger - Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG-DIESE-SYMMES, 38000 Grenoble, France. Email: [pierre-henri.elchinger@cea.fr](mailto:pierre-henri.elchinger@cea.fr)

Renaud Dumas - Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, INRAE, IRIG-DBSCI-LPCV, 38000 Grenoble, France. Email: [renaud.dumas@cea.fr](mailto:renaud.dumas@cea.fr)

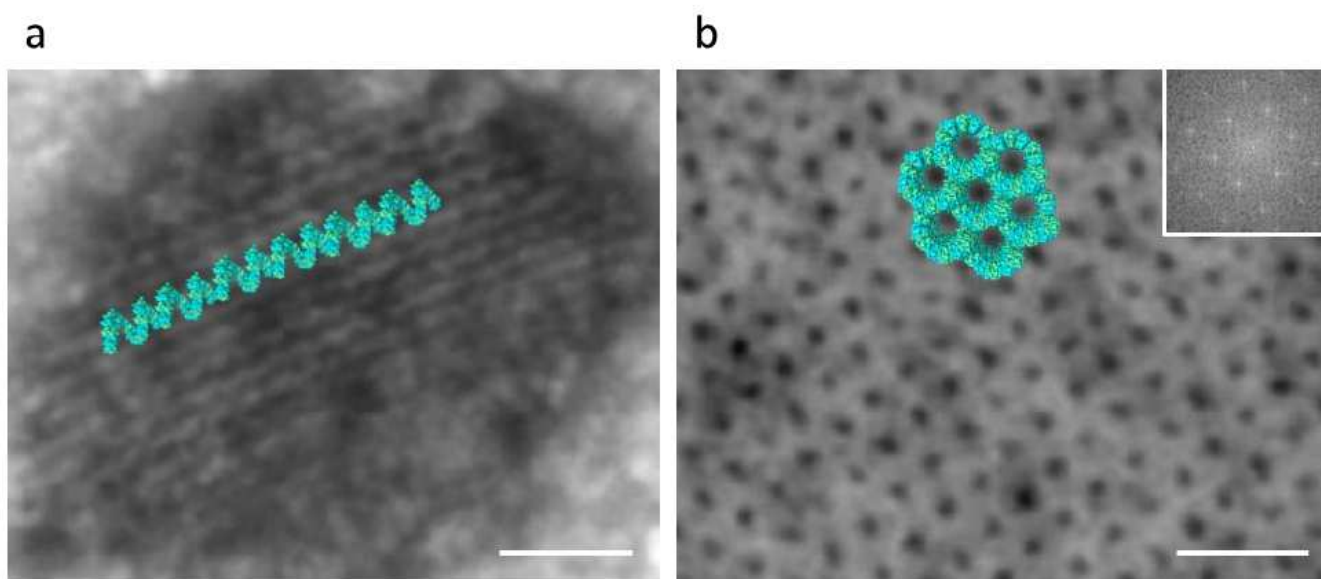
**Table S1.** Overview on Protein self-assemblies.

Nature of pattern	Self-assembly mechanism	2D Dimension	Lattice shape of 2D array/ motif: diam, pore size	Distance between motifs (pitch)	Average height of 2D array	Field of application	Ref
<b>Recrystallisation of S and T layer</b>							
2D array	Recrystallisation of T-layer	500 nm x 500 nm	Cylindrical: pore 6.5 nm	13 nm	ND	ND	1
2D array	Ca <sup>2+</sup> coordination of monomers from S-layer	2 μm x 10 μm	Square	13 nm	1-2 layers (9-15 nm)	ND	2
2D array	Recrystallization of S-layer fused to streptavidin	ND	Square: ND	10	1 layer (4.5 nm)	Nanopatterned matrix to arrange biotinylated compounds on a surface	3
<b>Disulfide formation or metal coordination</b>							
Nanorod, 2D array	Metal coordination of tunable acetyltransferase modified by bipyridine-alanine	2 μm x 2 μm	Honeycomb: pore 5 nm*	10 nm	1 layer (7 nm)	Tunable multicomponent assemblies	4
Nanotube, 2D to 3D	different Zn <sup>2+</sup> coordination of modified monomers	15 μm x 15 μm	Rectangular: pore 3 nm*	ND	1 layer (ND) to few layers (2D stacking)	ND	5
2D array	Disulfide formation or metal coordination of modified TMVCP <sup>a</sup>	1 μm x 1 μm	Square, honeycomb: pore 8 nm*	19-21 nm	2-3 layers (20-30 nm*)	Nanotechnology**	6
2D array	Disulfide formation or metal coordination of modified RhuA <sup>a</sup>	2 μm x 2 μm	Square: pore 1-4 nm	9-11 nm	1 layer (5 nm*) to few layers	ND	7
2D array	Metal coordination of modified STM4215	100 μm	Honeycomb: pore 5 nm	7 nm	1 layer (5 nm)	Nanotechnology**	8
2D array	Disulfide formation of modified rHuHF (ferritin)	ND	Square: pore 8 nm*	12.5 nm	ND	Proof of concept for further application to other proteins	9
2D array	Disulfide formation modified RhuA <sup>a</sup>	2.4 μm x 2.4 μm	Square: pore 6 nm*	11.4 nm	ND	Creation of AuNP lattices for nanotechnology	10
<b>Lectin/Sugar and Rodhamin dimerization</b>							
Nanorod, and ribbon, 2D array, 3D	Tetrameric lectin (LECA) connected by sugar and rodhamin interaction	100 nm x 100 nm	Square: pore 3 nm*	5 nm	1 layer (2 nm) to few layers (2D stacking)	Tunable multicomponent assemblies	11
2D array	Tetrameric lectin (CONA) connected by sugar and rodhamin interaction	100 μm x 100 μm	Square: pore 7 nm*	8 nm*	Several layers (200 nm)	Tunable multicomponent assemblies	12
<b>Genetic fusion of subunits from protein assemblies fusion</b>							
2D array	Interaction between receptor (streptavidin) and ligand (Steptag)-fused protein	ND	Square: pore 8 nm*	14 nm	1 layer (ND)	Design biomaterials with diverse properties	13
<b>Hydrophobic interaction</b>							
2D array	Non-covalent interaction of class 1-2 hydrophobins	1 μm x 1 μm*	-Rodlet (class 1): no pores -Mesh (class 2): pore 20-30 nm	ND	-Rodlet ND -Mesh, 1 layer (2 nm)	Modification of the wettability of hydrophobic surface	14
2D array, 3D	Hydrophobic interaction between amyloid residues of modified ferritin	500 nm x 500 nm*	Square: cage 8 nm*	12.6 nm	1 layer (10 nm) to several layers (114 nm)	Control 2D or 3D protein self-assemblies	15
2D array, 3D	Hydrophobic interaction between aromatic amino acids modified ferritin	ND	Square: cage 8 nm	11.4 nm	1 layer (11.5 nm) to several layers (ND)	Templates for the fabrication of 2D, 3D nanoparticle arrays	16
<b>De novo computational design</b>							
2D array	Computational design of protein/protein interaction	1 μm x 1 μm	Ring, rectangular or triangular: pore < 5 nm	5 - 15 nm	1 layer, 3-8 nm	Nanotechnology**	17
2D array	Computational design of protein/protein interaction	200 nm x 200 nm	Rectangular: pore 2.3 nm*	4 nm*	1 layer (2.4 nm)	Programmable protein assembly	18
Nanowire, 2D array	Computational design of protein-surface interaction	ND ou 850 nm x 850 nm*	Tunable honeycomb: pore (9-30 nm)	Tunable distance (11-30 nm)	1 layer (ND)	Design of protein-inorganic hybrid materials	19
<b>Enzyme-triggered covalent protein assembly</b>							
Nanotube, 2D array	Covalent assembly of modified SP1 via enzyme catalysis	200 nm x 200 nm	Honeycomb: pore 2.5 nm	11 nm*	1 layer (4 nm)	Energy transfer through quantum-dot	20
<b>Head-tail interaction</b>							
3D array	Oligomerization domain	2 μm x 2 μm	Honeycomb: pore 5 nm	8 nm	Helicoidal self-assembly (31 nm = 40 layers)	Pores modification for Nanotechnology	This work

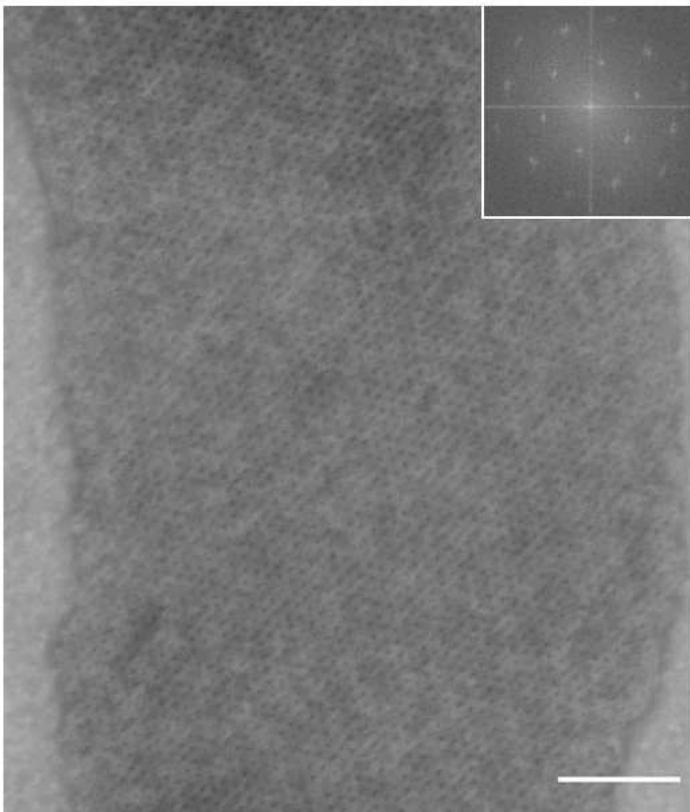
\*Values deduced from publication, \*\* Potential applications, no work done to test feasibility. ND, not described.

**Table S2.** Amino acid sequences of the N- and C-terminal extensions of the different proteins used.

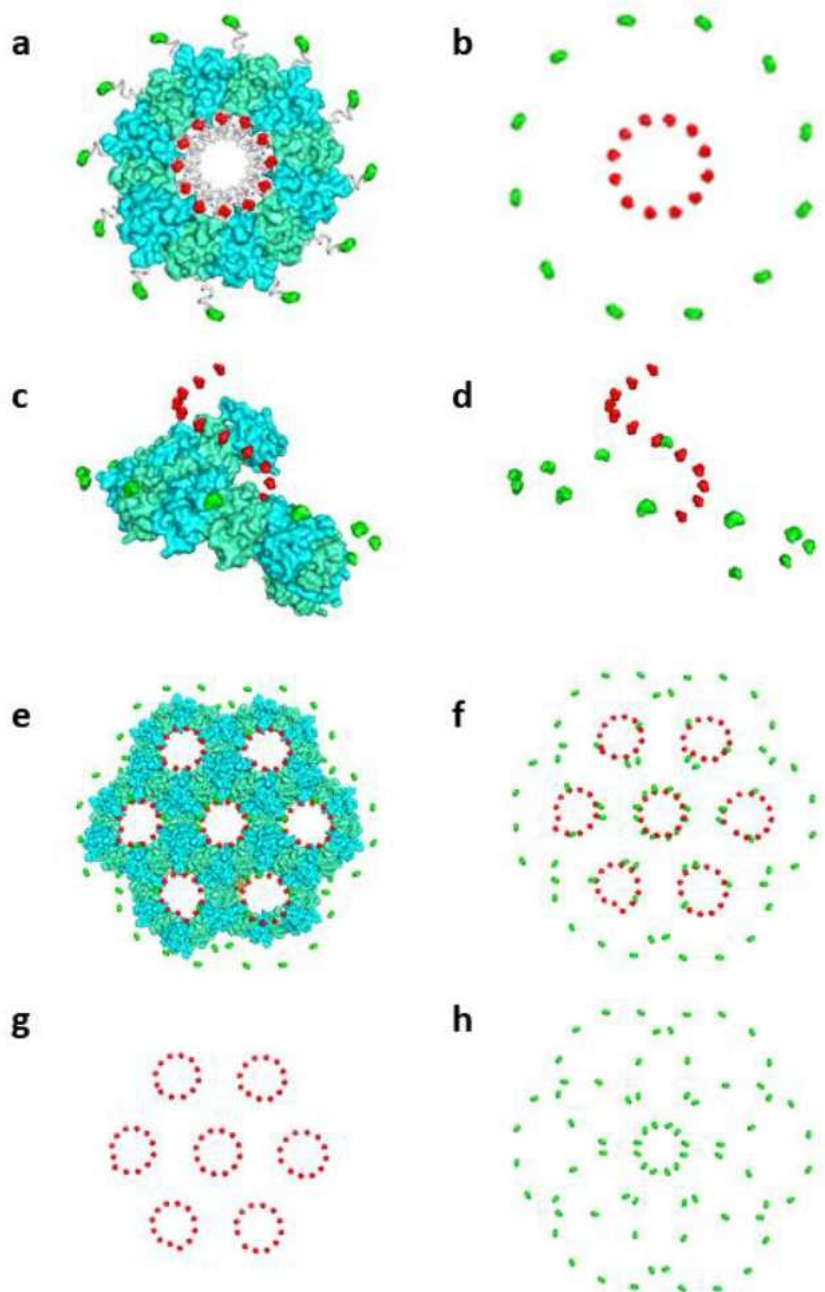
	N-terminal extension	C-terminal extension
GbLFY-SAM	MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGA	KKLDFVDVDGKRKADENALDLSQA
GbLFY-SAM N-terminal mutant	MKHHHHHHHP	KKLDFVDVDGKRKADENALDLSQA
GbLFY-SAM shortest N-terminal mutant	MHHHHHH	KKLDFVDVDGKRKADENALDLSQA
GbLFY-SAM short C-terminal mutant	MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGA	KKLDA
GbLFY-SAM K110C C-terminal mutant	MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGA	CKLDFVDVDGKRKADENALDLSQA
GbLFY-SAM linker 3CH C-terminal mutant	MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGA	GGSGGSCHCHCHC



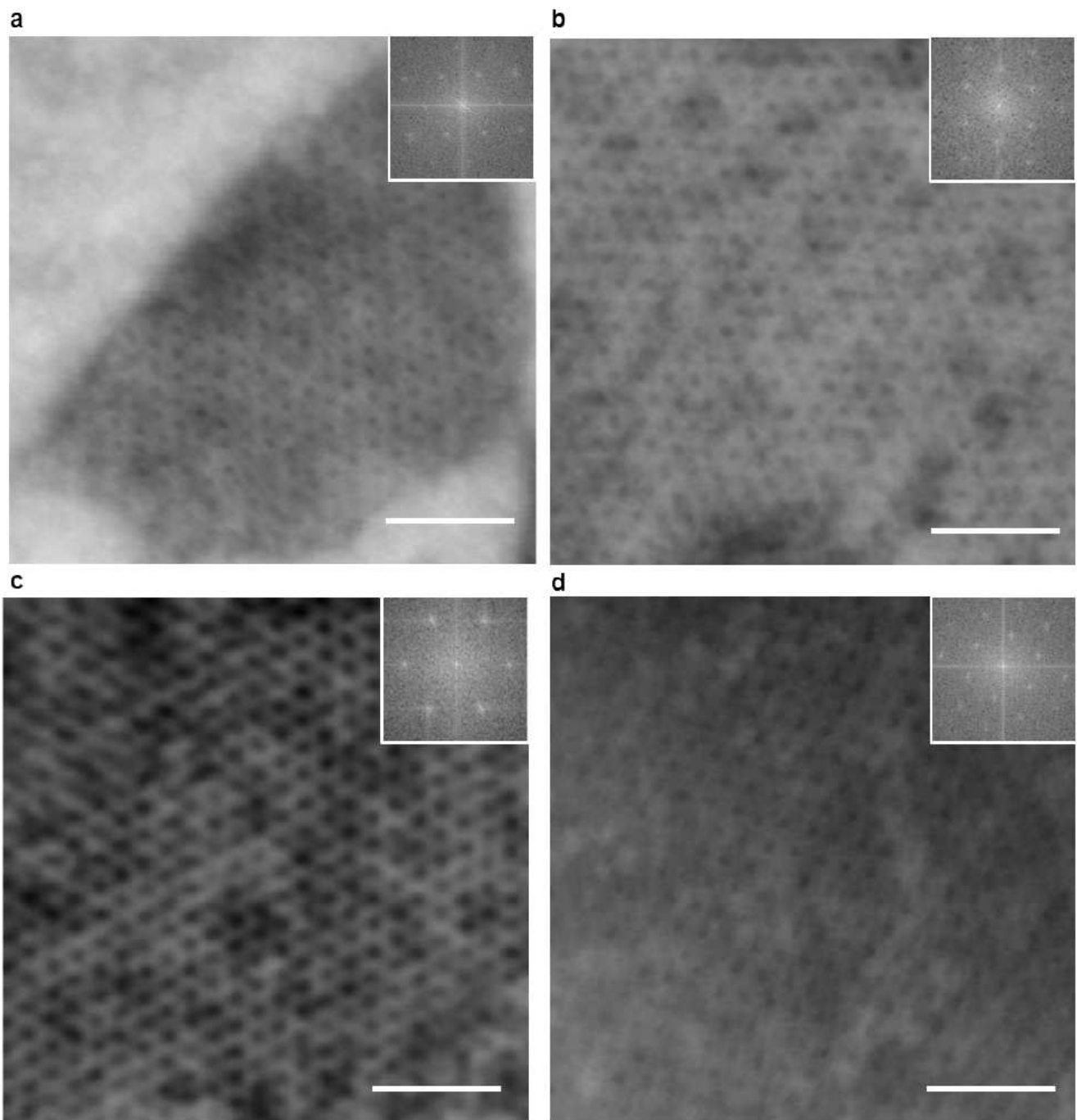
**Figure S1.** Superposition of GbLFY-SAM crystallographic structures to the self-assemblies. (a) Superposition of one helix to the self-assembly of GbLFY-SAM without its N-terminal. (b) Superposition of the honeycomb to the self-assembly of GbLFY-SAM with its N-terminal extension. The scale bars are 30 nm in both images.



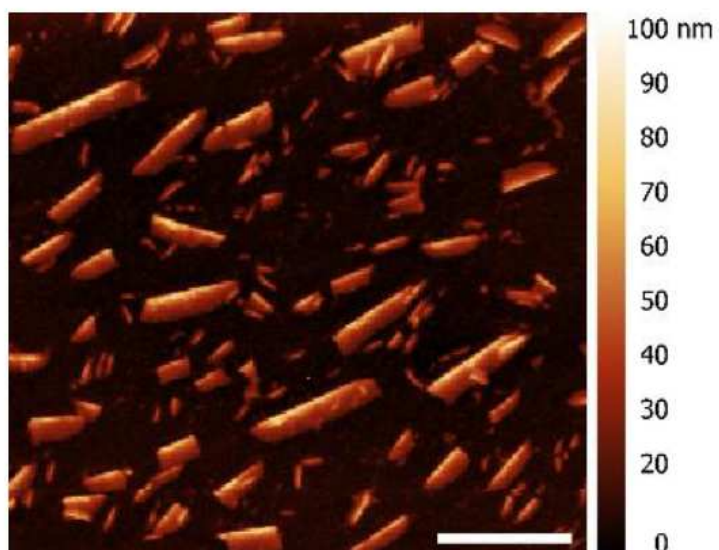
**Figure S2.** STEM image of GbLFY-SAM self-assembling in a honeycomb structure despite the addition of 1 mM EDTA. The Fourier Transform shown in inset confirm the conservation of the lattice parameters. Scale bar: 100 nm.



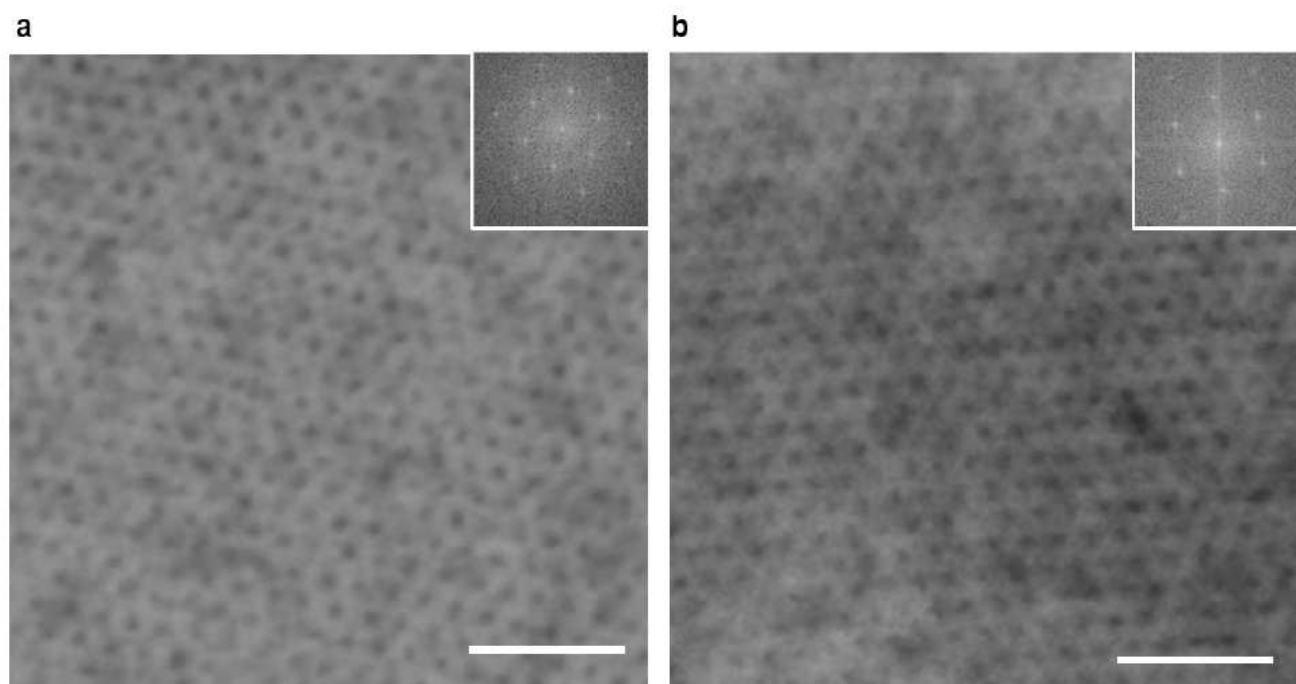
**Figure S3.** The polymeric honeycomb structure has a modular platform for broad applications. (a) view of 12 monomers modelled by I-TASSER forming one helix round with the first residues of the N-terminal shown as green surface and the last residues shown as red surface. For better visibility, only 12 out of 40 monomers are represented. (b) same representation with only the first and last residues shown as green and red surfaces. (c) and (d) lateral view of one helical polymer. (e) honeycomb formation by interaction between one central helical polymer and 6 helical polymers. (f) same representation with only the first and last residues shown as green and red surfaces (g) only the last residues shown as red surfaces or (h) only the first residues shown as green surfaces. Both N- and C-terminal extension are located inside the pores and could be used for specific grafting.



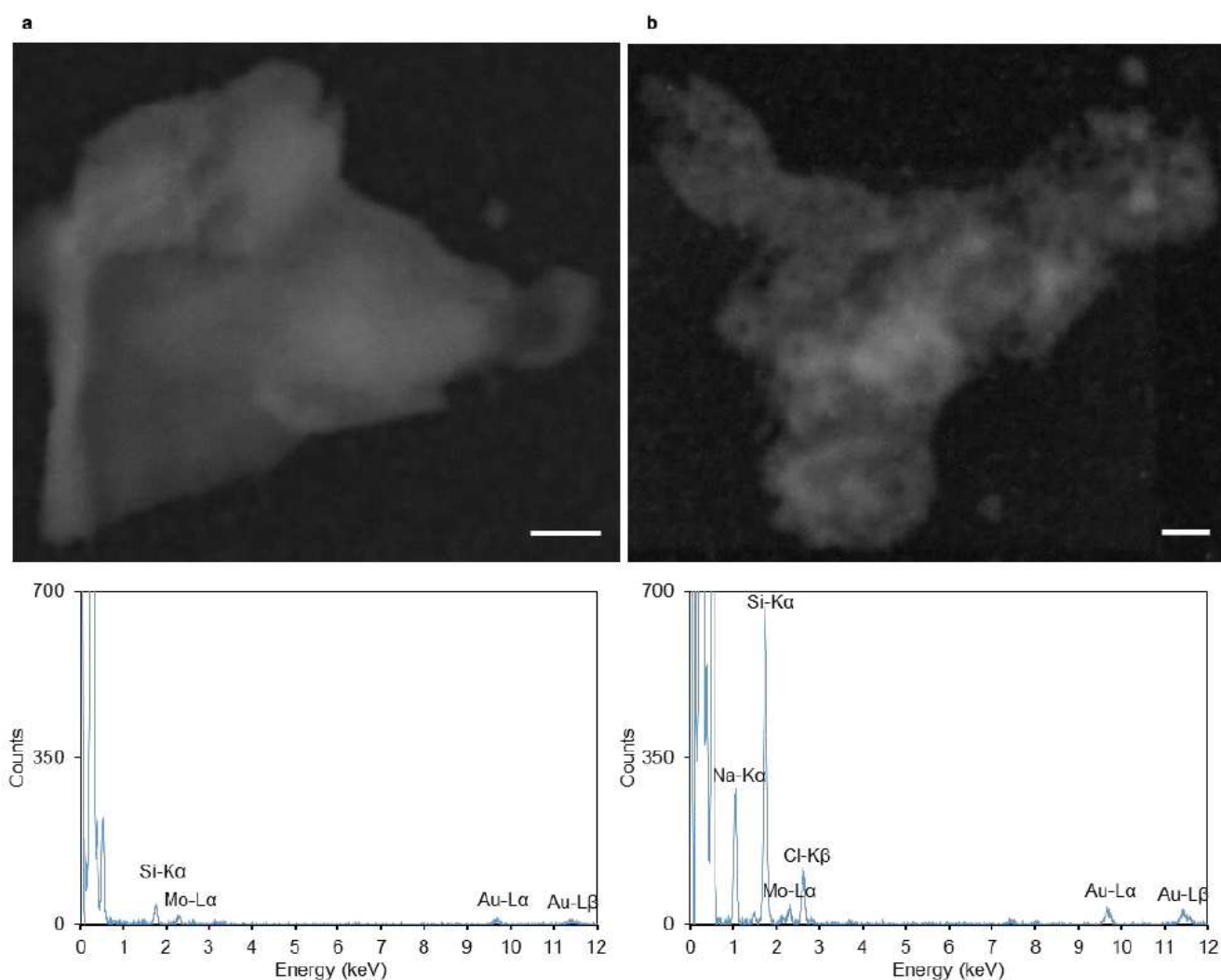
**Figure S4.** STEM image of engineered N-terminal (a) and C-terminal (b-d) GbLFY-SAM extension. (a) Self-assembly with only the first seven amino acid residues of the N-terminal extension. (b) Self-assembly with a deletion of the C-terminal part. (c) Self-assembly of GbLFY-SAM K110C. (d) Self-assembly with a GGSGGSCHCHC sequence instead of the C-terminal extension. The Fourier transform images shown in insert indicate that the engineered GbLFY-SAM have an architecture and dimensions similar to those observed with GbLFY-SAM. The scale bars are 50 nm in all the images.



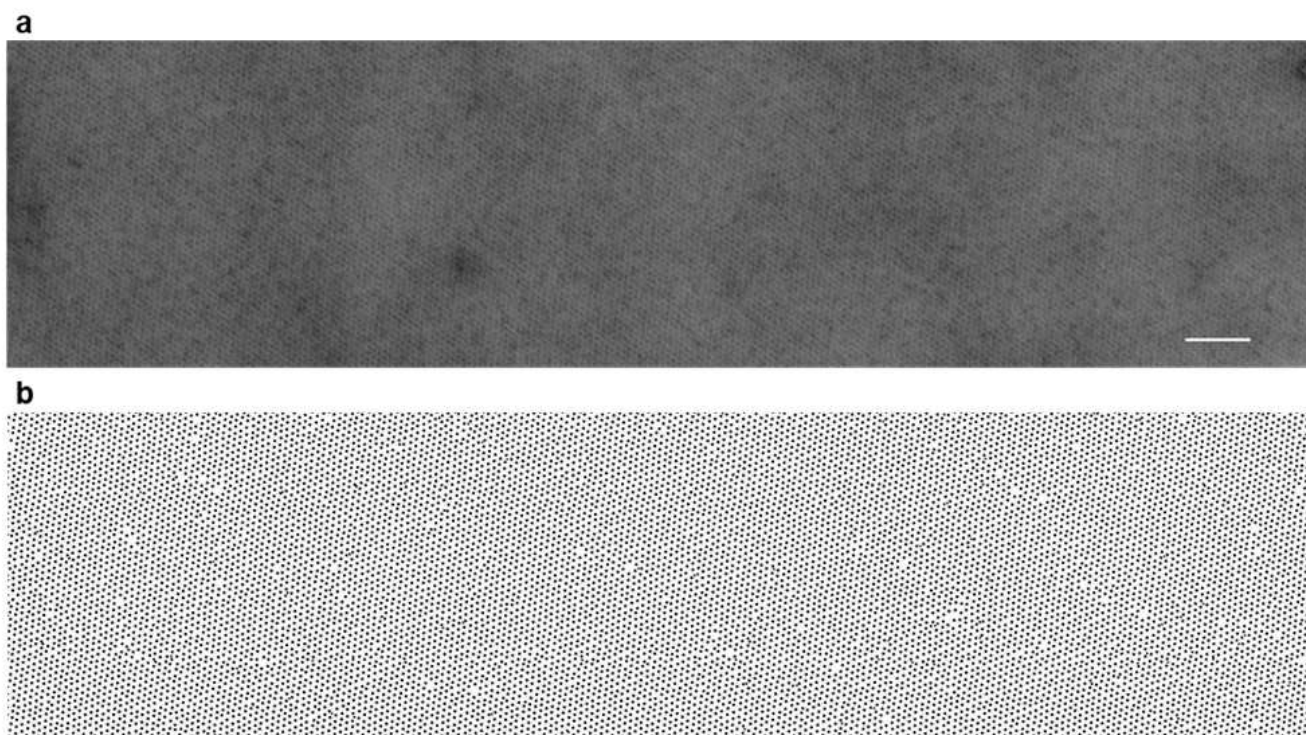
**Figure S5.** Measurement of the average height of the honeycomb of GbLFY-SAM with its N-terminal extension using AFM on several individual crystals. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ .



**Figure. S6.** STEM image of GbLFY-SAM self-assembly on hydrophobic (a) and hydrophilic (b) silicon nitride. (a) Self-assembly on a hydrophobic silicon nitride coated with alumina and fluoromethyl-silane. (b) Self-assembly on a hydrophilic silicon nitride coated with hydroxylated alumina. The fast Fourier transform of the images shown in insert indicate that the self-assemblies have an architecture and dimensions similar to those observed onto carbon and silicon surfaces. The scale bars are 50 nm in both images.



**Figure S7.** In presence of 1 mM EDTA, Ni<sup>2+</sup> salt are desorbed from GbLFY-SAM self-assembly. (a) *Top*, STEM image in dark field mode of an unstained self-assembly. *Bottom*, EDX spectrum of the self-assembly showing the absence of uranyl acetate. (b) *Top*, STEM image in dark field mode of a self-assembly after the Ni<sup>2+</sup> salt desorption chelated thanks to the 1 mM EDTA. *Bottom*, EDX spectrum of the self-assembly showing that nickel is out of the self-assembly. All the scale bars are 100 nm in both images.



**Figure S8.** Self-assembly as a platform for specific grafting of a huge number of ligands. (a) Self-assembly of GbLFY-SAM on a  $1 \mu\text{m}^2$  carbon surface. Scale bar: 100 nm. (b) Determination of the number of honeycomb pores on the surface of  $1 \mu\text{m}^2$  shown in (a) using Fiji. In this area the self-assembly provides a surface density of 11 835 available pores per  $\mu\text{m}^2$ . Considering that each pore corresponds to a stacking of an average of 40 GbLFY-SAM monomers, and assuming that at least one terminal extension of each monomer could be modified for grafting, this self-assembly presents  $485\,235/\mu\text{m}^2$  specific grafting sites for metal, organic or inorganic compounds for various applications.

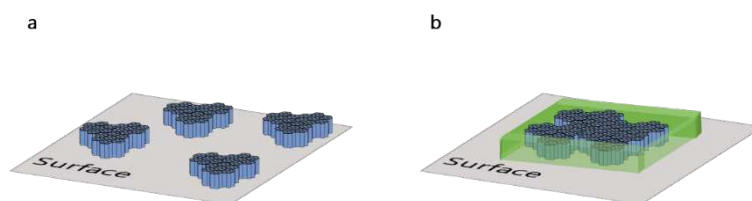
- (1) Aebi, U.; Smith, P. R.; Dubochet, J.; Henry, C.; Kellenberger, E. A Study of the Structure of the T-Layer of *Bacillus Brevis*. *J. Supramol. Struct.* **1973**, *1* (6), 498–522. <https://doi.org/10.1002/jss.400010606>.
- (2) Györvary, E. S.; Stein, O.; Pum, D.; Sleytr, U. B. Self-Assembly and Recrystallization of Bacterial S-Layer Proteins at Silicon Supports Imaged in Real Time by Atomic Force Microscopy. *J. Microsc.* **2003**, *212* (3), 300–306.
- (3) Moll, D.; Huber, C.; Schlegel, B.; Pum, D.; Sleytr, U. B.; Sara, M. S-Layer-Streptavidin Fusion Proteins as Template for Nanopatterned Molecular Arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (23), 14646–14651. <https://doi.org/10.1073/pnas.232299399>.
- (4) Yang, M.; Song, W. J. Diverse Protein Assembly Driven by Metal and Chelating Amino Acids with Selectivity and Tunability. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13491-w>.
- (5) Brodin, J. D.; Ambroggio, X. I.; Tang, C.; Parent, K. N.; Baker, T. S.; Tezcan, F. A. Metal-Directed, Chemically Tunable Assembly of One-, Two- and Three-Dimensional Crystalline Protein Arrays. *Nat. Chem.* **2012**, *4* (5), 375–382. <https://doi.org/10.1038/nchem.1290>.
- (6) Zhang, J.; Wang, X.; Zhou, K.; Chen, G.; Wang, Q. Self-Assembly of Protein Crystals with Different Crystal Structures Using Tobacco Mosaic Virus Coat Protein as a Building Block. *ACS Nano* **2018**, *12* (2), 1673–1679. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08316>.
- (7) Suzuki, Y.; Cardone, G.; Restrepo, D.; Zavattieri, P. D.; Baker, T. S.; Tezcan, F. A. Self-Assembly of Coherently Dynamic, Auxetic, Two-Dimensional Protein Crystals. *Nature* **2016**, *533* (7603), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature17633>.
- (8) Mattheaei, J. F.; DiMaio, F.; Richards, J. J.; Pozzo, L. D.; Baker, D.; Baneyx, F. Designing Two-Dimensional Protein Arrays through Fusion of Multimers and Interface Mutations. *Nano Lett.* **2015**, *15* (8), 5235–5239. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b01499>.
- (9) Zhou, K.; Chen, H.; Zhang, S.; Wang, Y.; Zhao, G. Disulfide-Mediated Reversible Two-Dimensional Self-Assembly of Protein Nanocages. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (52), 7510–7513. <https://doi.org/10.1039/C9CC03085A>.
- (10) Du, M.; Zhou, K.; Wang, X.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Dong, J.; Wu, L.; Qiao, Z.; Chen, G.; Wang, Q. Precise Fabrication of De Novo Nanoparticle Lattices on Dynamic 2D Protein Crystalline Lattices. *Nano Lett.* **2020**, *20* (2), 1154–1160. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b04574>.
- (11) Yang, G.; Ding, H.; Kochovski, Z.; Hu, R.; Lu, Y.; Ma, Y.; Chen, G.; Jiang, M. Highly Ordered Self-Assembly of Native Proteins into 1D, 2D, and 3D Structures Modulated by the Tether Length of Assembly-Inducing Ligands.

- Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (36), 10691–10695.  
<https://doi.org/10.1002/anie.201703052>.
- (12) Sakai, F.; Yang, G.; Weiss, M. S.; Liu, Y.; Chen, G.; Jiang, M. Protein Crystalline Frameworks with Controllable Interpenetration Directed by Dual Supramolecular Interactions. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (1).  
<https://doi.org/10.1038/ncomms5634>.
- (13) Sinclair, J. C.; Davies, K. M.; Vénien-Bryan, C.; Noble, M. E. M. Generation of Protein Lattices by Fusing Proteins with Matching Rotational Symmetry. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6* (9), 558–562.  
<https://doi.org/10.1038/nnano.2011.122>.
- (14) Lo, V.; Ren, Q.; Pham, C.; Morris, V.; Kwan, A.; Sunde, M. Fungal Hydrophobin Proteins Produce Self-Assembling Protein Films with Diverse Structure and Chemical Stability. *Nanomaterials* **2014**, *4* (3), 827–843.  
<https://doi.org/10.3390/nano4030827>.
- (15) Zheng, B.; Zhou, K.; Zhang, T.; Lv, C.; Zhao, G. Designed Two- and Three-Dimensional Protein Nanocage Networks Driven by Hydrophobic Interactions Contributed by Amyloidogenic Motifs. *Nano Lett.* **2019**, *19* (6), 4023–4028. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b01365>.
- (16) Zhou, K.; Zang, J.; Chen, H.; Wang, W.; Wang, H.; Zhao, G. On-Axis Alignment of Protein Nanocage Assemblies from 2D to 3D through the Aromatic Stacking Interactions of Amino Acid Residues. *ACS Nano* **2018**, *12* (11), 11323–11332. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b06091>.
- (17) Gonen, S.; DiMaio, F.; Gonen, T.; Baker, D. Design of Ordered Two-Dimensional Arrays Mediated by Noncovalent Protein-Protein Interfaces. *Science* **2015**, *348* (6241), 1365–1368.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaa9897>.
- (18) Chen, Z.; Johnson, M. C.; Chen, J.; Bick, M. J.; Boyken, S. E.; Lin, B.; De Yoreo, J. J.; Kollman, J. M.; Baker, D.; DiMaio, F. Self-Assembling 2D Arrays with *de Novo* Protein Building Blocks. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (22), 8891–8895. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b01978>.
- (19) Pyles, H.; Zhang, S.; De Yoreo, J. J.; Baker, D. Controlling Protein Assembly on Inorganic Crystals through Designed Protein Interfaces. *Nature* **2019**, *571* (7764), 251–256. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1361-6>.
- (20) Zhao, L.; Zou, H.; Zhang, H.; Sun, H.; Wang, T.; Pan, T.; Li, X.; Bai, Y.; Qiao, S.; Luo, Q.; Xu, J.; Hou, C.; Liu, J. Enzyme-Triggered Defined Protein Nanoarrays: Efficient Light-Harvesting Systems to Mimic Chloroplasts. *ACS Nano* **2017**, *11* (1), 938–945. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07527>.

## 2.2 Résultats complémentaires

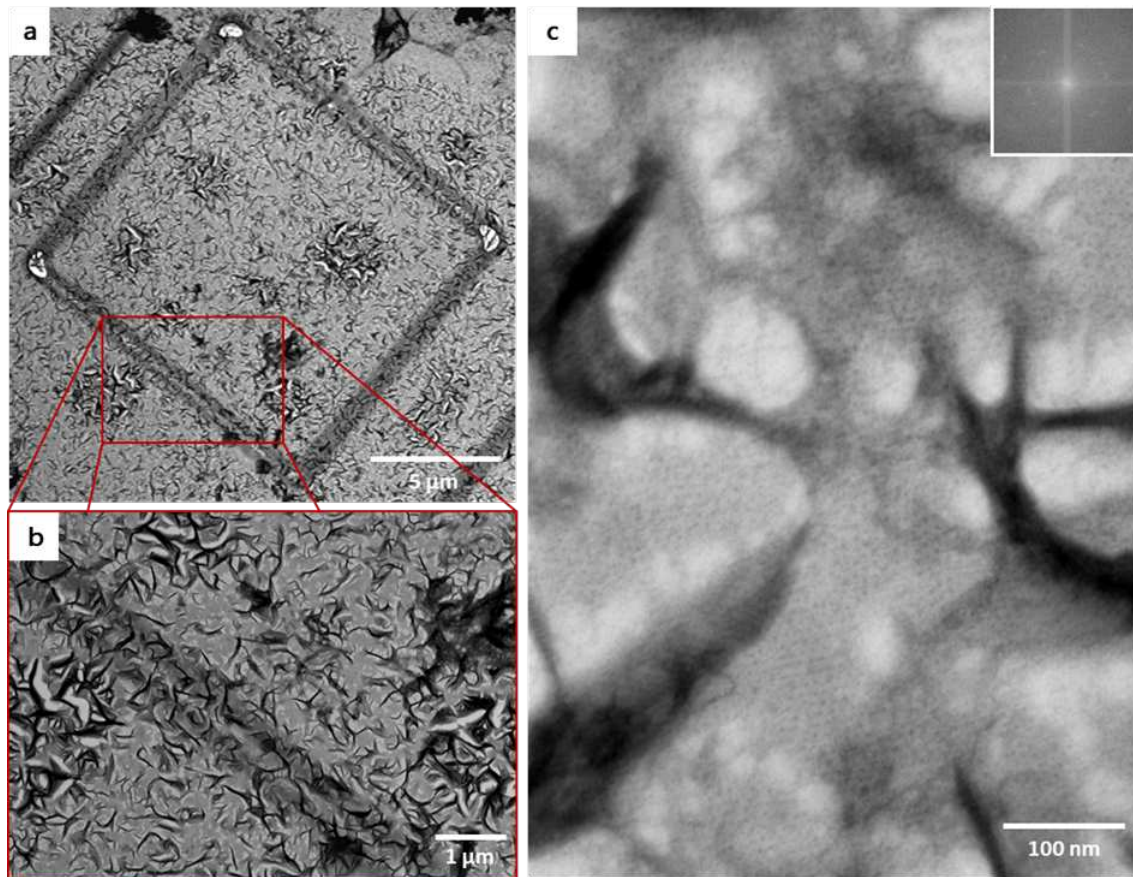
### 2.2.1 Croissance contrainte des auto-assemblages

Les résultats présentés dans l'article montrent que, sur surface, GbLFY-SAM s'organise de manière à former des dizaines d'auto-assemblages de quelques  $\mu\text{m}^2$  qui sont distincts les uns des autres. Cela signifie que la surface présente des zones vides d'auto-assemblages. Or, si nous projetons l'utilisation de ces structures dans le cas d'application en biocapteur par exemple, cette hétérogénéité entraînera un moyennage du signal et donc une perte de sensibilité. Il faudrait alors, à partir de ces auto-assemblages distincts, former une couche uniforme et homogène. Pour ce faire, les auto-assemblages peuvent être adressés physiquement ou chimiquement sur une surface. L'idée est de contraindre leur croissance dans une zone spécifique de la surface réunissant ainsi les auto-assemblages distincts en couche uniforme (Figure 2.3).



**Figure 2.3 :** Sur une surface, GbLFY-SAM va former des auto-assemblages distincts (a). La construction de structures sur cette surface devrait contraindre les auto-assemblages à former une couche uniforme (b).

Nous avons dans un premier temps choisi d'utiliser la technique de sonde ionique focalisée (*focused ion beam*, FIB) pour créer des structures sur le dessus des grilles de microscopie en carbone. Le FIB peut s'apparenter au SEM mais la surface de l'échantillon est balayée par un faisceau d'ions et non un faisceau d'électrons. En utilisant ce faisceau d'ions, (ici ce sont des ions gallium), il est possible de réaliser un dépôt de matériaux comme du platine ou du carbone. Un gaz précurseur du matériel choisi est injecté dans la chambre à vide puis, en balayant une zone précise de l'échantillon avec le faisceau d'ions, une couche de matériel va être déposée<sup>318</sup>. Ici, nous avons décidé de réaliser plusieurs formes sur la grille dont des carrés de 14  $\mu\text{m}$  côté en carbone et une hauteur d'environ 100 nm. Cette expérience était un premier test afin d'observer la manière dont GbLFY-SAM allait s'auto-assembler au contact de ces structures. Nous avons observé que l'auto-assemblage de GbLFY-SAM avait abouti à une sorte de film capable d'épouser parfaitement les carrés formés grâce au FIB (Figure 2.4.a et b). La croissance contrainte dans ces conditions n'est alors pas possible car les auto-assemblages ne sont pas contenus dans les structures dédiées.



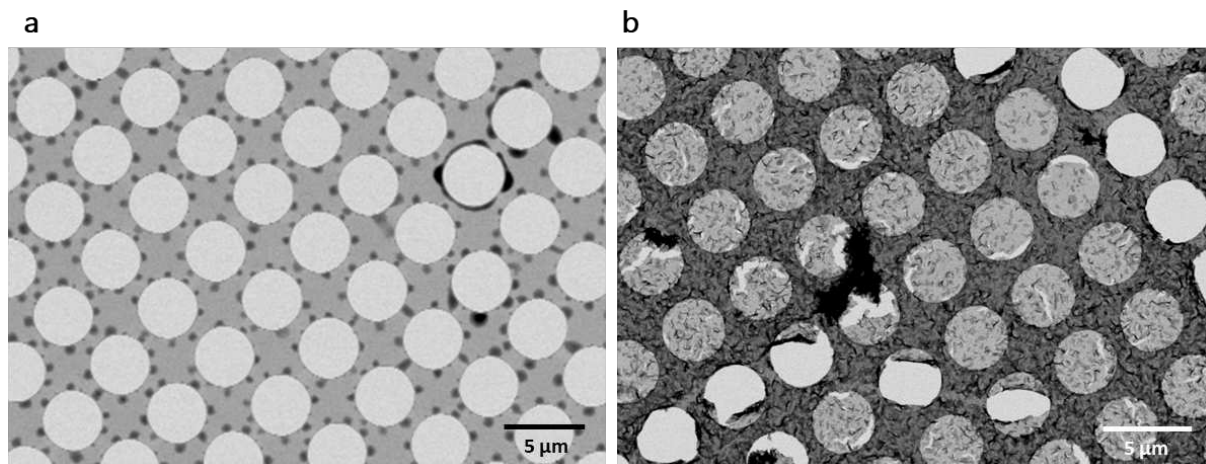
**Figure 2.4 :** La croissance contrainte des auto-assemblages de GbLFY-SAM en utilisant des structures réalisées grâce au FIB montre que la protéine forme un film protéique qui recouvre entièrement le carré (a et b). Ce film présente une structure de type nid d'abeille (c).

L'observation de ce film a un plus fort grossissement (Figure 2.4.c) et la transformée de Fourier rapide (*Fast Fourier Transform*, FFT) confirme la structure en nid d'abeille. Cette transformation mathématique de l'image permet de déduire des fréquences qui sont directement associées aux paramètres de maille de l'auto-assemblage. La maille est définie comme étant le plus petit motif dans l'espace qui peut être répété à l'infini par un phénomène de translation pour reconstituer l'auto-assemblage. La maille est constituée de deux paramètres  $a$  et  $b$  décrivant sa taille dans deux directions de l'espace et du paramètre  $\gamma$  qui traduit l'angle d'éloignement entre ces deux axes. Cependant cette organisation un peu tentaculaire n'avait jamais été observée auparavant. Deux hypothèses de formation de ce film sont alors possibles. Soit l'ionisation de la surface par les ions  $\text{Ga}^{3+}$  a créé des conditions favorables à sa formation. Soit ce film était présent dans toutes les expériences réalisées jusqu'à présent mais son épaisseur est si faible qu'il contraste trop peu par rapport au film carbone de la grille TEM ce qui le rend non visible.

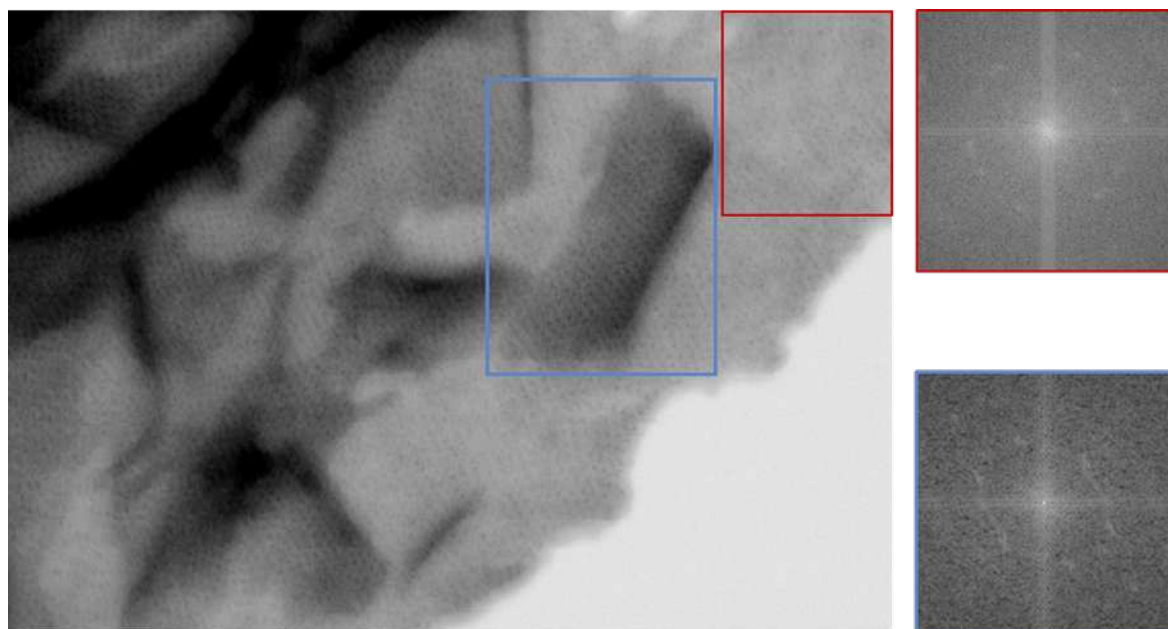
### 2.2.2 Auto-assemblages et film protéique organisé

Si le film protéique observé précédemment est présent sans l'utilisation des ions  $\text{Ga}^{3+}$  mais qu'il est peu épais, il ne sera difficilement observable sur les grilles de TEM présentant un film carbone amorphe de 20 à 30 nm d'épaisseur. Afin d'étudier plus en détail ce film protéique, nous avons donc changé la nature des grilles de microscopie et choisi d'utiliser des grilles Quantifoil® qui sont des grilles en or sur lesquelles un film carbone, présentant des trous réguliers d'une taille définie, est déposé. Si le film protéique est présent en utilisant les conditions classiques d'auto-

assemblage alors il devrait pousser entre les trous du film carbone et ainsi être observable. Comparé à la grille témoin sans protéine (Figure 2.5.a), la vue d'un champ large de la grille sur laquelle GbLFY-SAM s'est auto-assemblée (Figure 2.5.b) montre qu'une large partie des trous du film carbone est remplie. Il semble alors qu'il y ait un film protéique continu recouvrant toute la surface de la grille. De plus, sur ce film reposent les auto-assemblages observés auparavant.



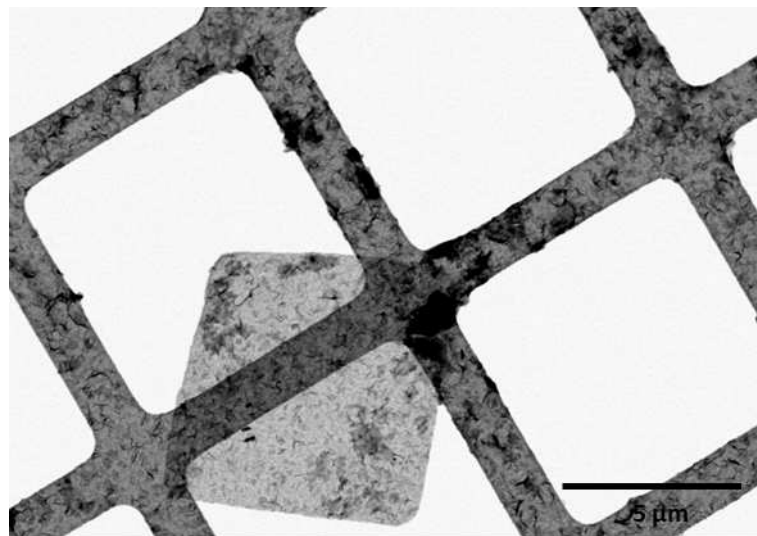
**Figure 2.5 :** Auto-assemblage de GbLFY-SAM sur une grille Quantifoil®. La grille témoin sans protéine (a) montre que les trous du film carbone de la grille restent vides. La grille sur laquelle GbLFY-SAM s'est auto-assemblée (b) montre que la majorité des pores sont remplis par un film protéique sur lequel sont déposés les auto-assemblages de 31 nm de hauteur. Les trous du film carbone qui ne sont pas remplis sont vraisemblablement des endroits dans lesquels le film protéique s'est déchiré et replié sur lui-même.



**Figure 2.6 :** Zoom sur un auto-assemblage au milieu d'un trou de la grille. L'auto-assemblage (encadré en bleu) ressemble à ceux observés auparavant. Dans le film protéique (encadré en rouge), il y a l'apparition de points noirs qui correspondent aux nids d'abeille. Les FFT correspondantes aux zones encadrées sont présentées à droite de l'image. Elles attestent, même si les fréquences sont dédoublées, que la structure en nid d'abeille est présente.

Lorsque nous observons à un plus fort grossissement un auto-assemblage au niveau d'un trou du film carbone (Figure 2.6), nous observons d'abord les points correspondant aux pores des nids d'abeille de cet auto-assemblage (encadré bleu) puis, dans le fond, apparaissent aussi d'autres points au niveau du film protéique (encadré rouge). Nous en concluons que le film protéique, sur lequel les auto-assemblages de 31 nm de haut reposent, est organisé et qu'il recouvre la grille de microscopie en entier. Par ailleurs, il semblerait que les pores des auto-assemblages de 31 nm de hauteur (au centre du carré bleu) soient continus par rapport à ceux du film protéique du dessous.

Il est aussi intéressant de noter que cette structure (film protéique organisé + auto-assemblages de 31 nm de hauteur) est très résistante comme le montre ce carré de  $7 \times 7 \mu\text{m}^2$  qui s'est déplacé sur la grille (Figure 2.7).



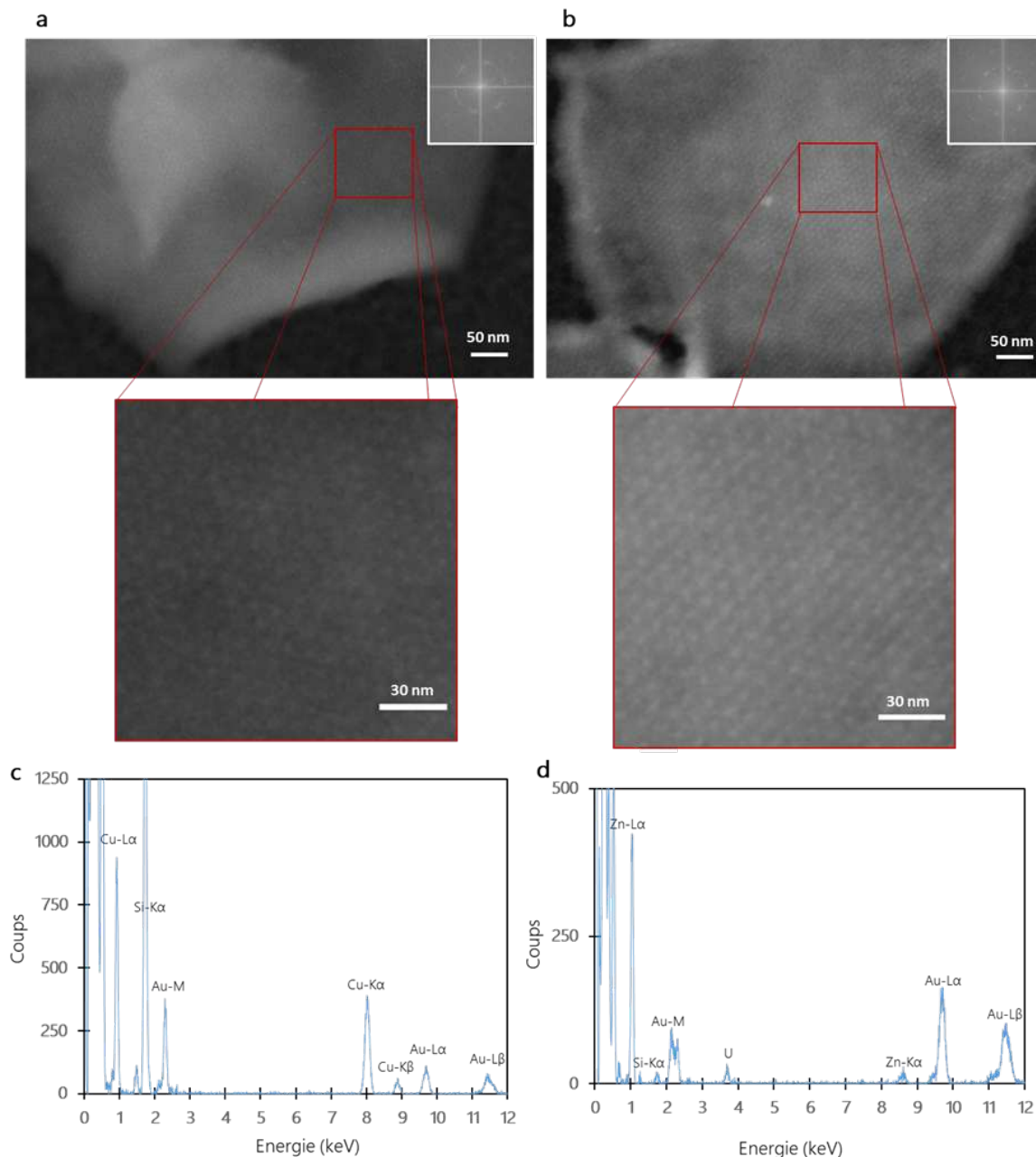
**Figure 2.7 :** Le film protéique sur lequel sont déposés les auto-assemblages de 31 nm de hauteur semble assez résistant comme le montre ce carré qui s'est détaché puis reposé sur la grille.

Le fait que nous n'ayons pas observé ce film protéique organisé jusqu'alors en microscopie électronique peut être dû au film carbone amorphe des grilles utilisées jusqu'à présent. Ce film carbone a une épaisseur entre 20 et 40 nm. Il apparaît alors que si le film protéique organisé est peu épais alors il ne sera pas assez contrasté ce qui ne permettra pas son observation. Cela nous donne une première indication sur la hauteur de ce film protéique organisé qui doit être largement inférieure à 31 nm. Une appréciation plus précise de la hauteur de ce film protéique organisé sera donnée dans le Chapitre 4 section 4.2.4.2. Ce film protéique étant organisé mais aussi capable de recouvrir de larges surfaces, il pourrait être très intéressant pour des applications de type biocapteur car il permet d'avoir une surface homogène. L'étude de la cinétique de formation de ce film paraît alors nécessaire afin de mieux comprendre la croissance de celui-ci. Cela permettrait aussi de déterminer à quel moment les auto-assemblages de 31 nm se développent.

Par ailleurs, l'adressage physique proposé dans la section 2.2.1 ne paraît plus adapté. En effet, même en imposant une certaine topographie de surface, GbLFY-SAM va créer ce film protéique organisé qui est capable d'épouser parfaitement les formes présentes sur la surface. Nous montrerons par la suite (Chapitre 4) qu'il est possible d'utiliser un automate de dépôt pour adresser l'auto-assemblage de GbLFY-SAM précisément sur la surface.

### 2.2.3 Extension du marquage des pores à d'autres métaux divalents

Dans les expériences de l'article, nous avons montré qu'il était possible de fonctionnaliser l'intérieur des pores des auto-assemblages en utilisant des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et que les contours de ces mêmes pores peuvent être marqués en utilisant les ions  $\text{Au}^{3+}$ . Cette fonctionnalisation spécifique est possible en tirant parti de l'affinité spécifique entre les histidines et les ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Or, le nickel n'est pas le seul métal qui peut être chélaté par les histidines<sup>319</sup>. Parmi ces métaux, nous avons choisi de travailler avec le cuivre et le zinc. Le but de ces expériences est de montrer que les pores des auto-assemblages de GbLFY-SAM peuvent être fonctionnalisés de manière spécifique avec d'autres métaux que le nickel pour montrer la versatilité de ces auto-assemblages.

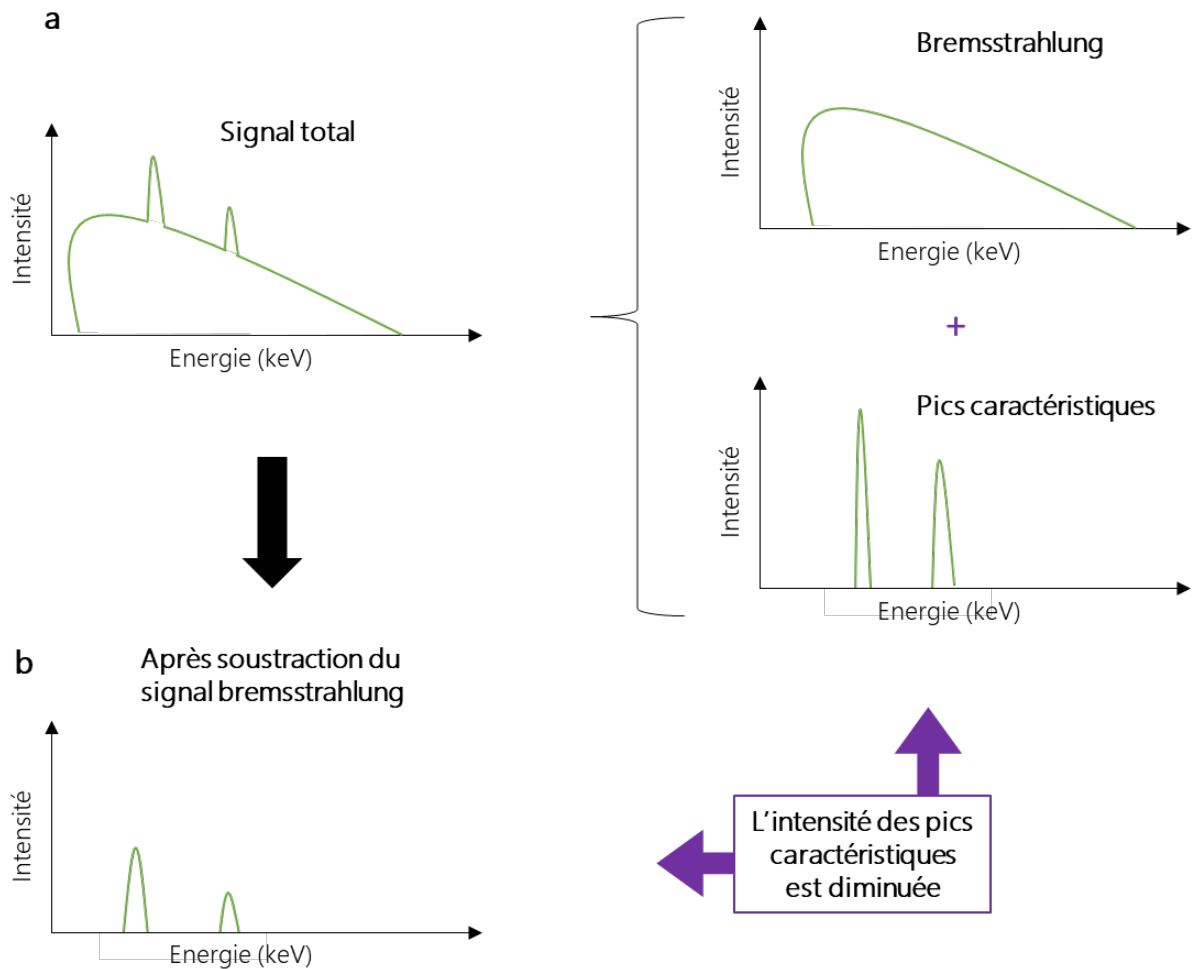


**Figure 2.8 :** La métallation des auto-assemblages GbLFY-SAM par les ions  $\text{Cu}^{2+}$ (a) et les ions  $\text{Zn}^{2+}$ (b) montre que ces métaux sont chélatés à l'intérieur des pores des auto-assemblages. Les spectres (respectivement c et d) permettent d'attester de la présence des métaux.

Les conditions de réaction utilisées ici sont les mêmes que celles utilisées pour la fonctionnalisation avec les ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Après l'étape d'auto-assemblage de GbLFY-SAM sur des grilles de microscopie, les auto-assemblages sont mis en contact avec 30 équivalents en  $\text{Cu}^{2+}$  ou en  $\text{Zn}^{2+}$ . Puis, les ions sont réduits *in situ* en utilisant du  $\text{NaBH}_4$ . De même, des spectres EDX pour les expériences avec les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et les ions  $\text{Zn}^{2+}$  ont été réalisés. Il est essentiel de retenir que le contraste obtenu sur ces images STEM n'est dû qu'à la présence des ions réduits. Les résultats sont présentés dans la Figure 2.8.

Que ce soit dans le cas des ions  $\text{Cu}^{2+}$  (Figure 2.8.a) ou des ions  $\text{Zn}^{2+}$  (Figure 2.8.b), c'est l'intérieur des pores des auto-assemblages GbLFY-SAM qui est fonctionnalisé. La présence de ces ions est confirmée par les spectres associés aux images (respectivement Figure 2.8.c et 2.8.d). Dans le spectre EDX pour le  $\text{Zn}^{2+}$ , il y a un petit pic à 3,7 keV qui est certainement dû à une faible contamination de l'échantillon par de l'acétate d'uranyle.

De ces expériences, nous pouvons en conclure que les ions métalliques divalents seront chélatés à l'intérieur des pores de l'auto-assemblage grâce aux histidines. Cela montre que même sans l'utilisation de mutation dans la séquence en acides aminés de GbLFY-SAM, il est possible d'avoir une fonctionnalisation *a minima* avec les ions métalliques qui ont de l'affinité pour les histidines. Pour aller plus loin dans ces expériences, il pourrait être envisagé de réaliser des expériences avec du  $\text{Fe}^{2+}$  et du  $\text{Fe}^{3+}$ . Nous nous attendrions alors à avoir un marquage à l'intérieur des pores en utilisant le  $\text{Fe}^{2+}$  et un marquage à l'extérieur des pores avec le  $\text{Fe}^{3+}$  ce qui permettrait d'asseoir les expériences réalisées jusqu'alors. Par ailleurs, l'utilisation des spectres EDX permet de confirmer la présence (ou l'absence) des ions métalliques mais ne nous renseigne pas sur leur localisation. Il est possible, par EDX, d'obtenir des cartographies (*i.e.* images en fausses couleurs des éléments présents dans l'échantillon). Lors des premières expériences de cartographie élémentaire, les temps d'acquisition prolongés ont abouti à la destruction de l'auto-assemblage étudié. Aussi, il n'a pas été possible d'obtenir d'information précise sur la quantité d'ions métalliques chélatés. Cependant en supposant que la liaison divalente entre les métaux et les histidines nécessite 2 histidines pour 1 ion métallique, pour chaque pore nous arrivons à 120 ions métalliques. Bien que l'analyse des différents éléments présents dans un échantillon soit facile par EDX, leur quantification n'est pas aisée notamment lorsqu'il s'agit de faible quantité. Ceci peut être expliqué par le phénomène de rayonnement de freinage (bremsstrahlung X-rays). Ce phénomène apparaît lorsqu'un électron du rayon incident entre directement en contact avec le noyau d'un atome. Cela entraîne une multiplication des pics d'énergie des rayons X pouvant alors recouvrir les pics caractéristiques de l'atome (Figure 2.9).



**Figure 2.9 :** Le signal total d'un spectre EDX (a) est composé à la fois des rayons X bremsstrahlung et des pics caractéristiques de l'échantillon (à droite). Lors de la soustraction des rayons X bremsstrahlung, l'intensité des pics caractéristiques de l'échantillon est diminuée (b).

Ainsi, si les échantillons présentent une faible quantité d'atomes d'intérêt, lorsque le spectre est corrigé pour soustraire le bruit de fond créé par ces rayons X bremsstrahlung, nous aurons une perte d'information quantitative.

### 2.3 Conclusion et perspectives du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'il était possible d'ancrer les auto-assemblages de GbLFY-SAM sur des surfaces de carbone ou de SiO<sub>2</sub> en ajoutant un tag histidines en N-terminale de la protéine. De plus, seuls les 7 premiers acides aminés de ce tag (MHHHHHH) sont nécessaires pour obtenir l'ancrage. Il est cependant à noter que l'utilisation de ce très court tag histidines aboutit à l'instabilité de la protéine qui aura tendance à plus fortement oligomériser plutôt qu'à s'auto-assembler. En revanche, lorsque l'on rajoute une Proline (P) à ce tag histidines (MHHHHHP), l'auto-assemblage est identique à l'utilisation du tag en entier. Les auto-assemblages ont aussi une hauteur moyenne de 31 nm. Bien que la microscopie corrélative sur un même auto-assemblage (Figure 3 de l'article) permet de confirmer que les structures observées en AFM sont les auto-assemblages, la structure en nid d'abeille n'est pas visible avec l'AFM en air. Il pourrait alors être envisagé de réaliser les expériences d'AFM en phase liquide<sup>320</sup>

et/ou de l'*high speed AFM*<sup>321</sup> qui sont deux techniques permettant de révéler des structures présentant des motifs inférieurs à 10 nm.

L'utilisation de métaux divalents ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ ) permet une fonctionnalisation spécifique des pores grâce à la présence des histidines du tag à l'intérieur de ceux-ci. La réduction de ces ions ne semble pas avoir d'impact sur l'intégrité structurale des auto-assemblages. Les spectres EDX confirment la présence des métaux mais ne renseignent pas sur leur degré d'oxydation qui est le reflet de la réduction des ions. Des expériences de spectrométrie photoélectronique X (*X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS) devraient être mises en place par la suite pour déterminer l'état d'oxydation des ions métalliques. Par ailleurs, il serait aussi intéressant de déterminer la morphologie qu'adoptent les ions réduits dans les pores. A titre d'exemple, les structures pourraient être soit une succession de nanoparticules accrochées régulièrement dans le pore soit une structure de type nanopilier. Cette morphologie pourrait être révélée en utilisant le FIB pour réaliser une *cross section* d'un auto-assemblage pour pouvoir l'observer par le côté.

Dans la littérature, il est montré que les structures métalliques notamment les nanoparticules ont des propriétés de catalyse<sup>322</sup>. Au-delà du côté décoratif des nanoparticules/nanopiliers métalliques à l'intérieur des pores, nous pouvons nous demander si elles gardent cette même activité lorsqu'elles sont emprisonnées dans l'auto-assemblage de GbLFY-SAM. Une première approche dans l'étude de cette activité sera présentée dans le Chapitre 4.

Nous avons aussi montré qu'il était possible de modifier la partie C- terminale sans que la structure en nid d'abeille ne soit perturbée notamment en ajoutant des séquences contenant des cystéines. Nous pouvons alors nous demander si n'importe quelle séquence peut être ajoutée en partie C- terminale et s'il est possible de pouvoir changer l'affinité des ions  $\text{Au}^{3+}$  du contour des pores vers l'intérieur de ceux-ci en utilisant les mutants cystéines. Des éléments de réponse à ces questions seront apportés dans le Chapitre 3 de mon manuscrit de thèse.

Enfin, la découverte d'un film protéique organisé et qui semble homogène sur la surface entière de la grille de microscopie permet d'envisager son utilisation dans des applications de type biocapteur. Ceci sera aussi abordé à la fin de mon manuscrit dans le Chapitre 4.



## Chapitre 3 : Une nanostructure en nid d'abeille adaptable grâce à la modulation de la partie C-terminale

Le second objectif de mes travaux de recherche a été de déterminer s'il était possible de moduler l'auto-assemblage de GbLFY-SAM sans nuire à son intégrité structurale. Ceci a été évoqué précédemment dans notre article publié dans *ACS Applied Nano Materials*. Nous avons déjà montré qu'il était possible de raccourcir la partie N-terminale de GbLFY-SAM en gardant uniquement les 7 premiers acides aminés de cette partie. Nous avons aussi évoqué le fait qu'il était possible de muter un acide aminé de la partie C-terminale (mutant K110C) ainsi que de remplacer totalement la partie C-terminale par une séquence définie (GGSGGSCHCHCHC) en gardant la structure caractéristique en nid d'abeille.

Au cours de ma thèse, d'autres mutants ont été conçus et produits pour montrer la grande versatilité de l'auto-assemblage en nid d'abeille. Par ailleurs, nous avons testé diverses techniques de greffage, notamment covalentes, sur ces mutants afin de montrer que l'auto-assemblage de GbLFY-SAM peut être utilisé comme une plateforme de greffage grâce à la modulation de la séquence en acide aminé de la partie C-terminale.

### 3.1 Caractéristiques des mutants de la partie C- terminale

#### 3.1.1 Stratégies de design des mutants

Dans la séquence en acide aminé de GbLFY-SAM il n'y a aucune cystéine. Or, la fonction thiol portée par la cystéine est utilisée pour fonctionnaliser de manière covalente des molécules comme des nanoparticules, des quantum dots ou encore des fluorophores sur les protéines<sup>316</sup>. Il a aussi été montré que la cystéine a une affinité spéciale avec l'or qu'il soit sous forme d'ions ou de nanoparticules<sup>323-325</sup>. La partie C- terminale de GbLFY-SAM étant située à l'intérieur des pores de l'auto-assemblage (Figure S3 de l'article du Chapitre 2), l'introduction d'une ou plusieurs cystéines à cet endroit permettrait de créer des antennes capables de chélater les ions  $Au^{3+}$ . A titre d'exemple, diriger les ions  $Au^{3+}$  à l'intérieur des pores de l'auto-assemblage créerait des nanostructures d'or de types nanoparticules ou nanopiliers qui pourraient servir par la suite à augmenter la sensibilité des biocapteurs.

La première stratégie de design qui a été mise en place a été l'incorporation d'une ou plusieurs cystéines dans la partie C- terminale de GbLFY-SAM. Plusieurs séquences ont été créées et sont consignées dans le tableau ci-après :

Nom de la protéine	Séquence de la partie C- terminale
GbLFY-SAM	KKLDFVDVDGKRKADENALDTLSQA
GbLFY-SAM <sub>K110C</sub>	CKLDFVDVDGKRKADENALDTLSQA
GbLFY-SAM <sub>C</sub>	KKGC
GbLFY-SAM <sub>(GGS)2 C</sub>	KKGGSGGSC
GbLFY-SAM <sub>(CH)3 C</sub>	KKGCHCHCHC
GbLFY-SAM <sub>(GGS)2 (CH)3 C</sub>	KKGGSGGSCHCHCHC

**Tableau 3.1** : Séquences en acide aminé de la partie C- terminale des mutants de GbLFY-SAM comportant des résidus cystéines.

L'utilisation de la glycine seule (G) ou de séquence répétée de glycine-glycine-sérine (GGS) permet de donner de la flexibilité à la partie C- terminale afin d'augmenter l'accessibilité de la séquence de greffage. Ces acides aminés ont des chaînes latérales qui sont peu encombrantes et leur confèrent ainsi une mobilité accrue dans l'espace. De plus, l'alternance entre les histidines et les cystéines a été mise en place pour attirer les ions  $Au^{3+}$ , mais surtout d'autres métaux divalents comme montrés dans le Chapitre 2. Ce design pourrait, par exemple, permettre de faire une double fonctionnalisation entre or et cuivre. La réduction de ces métaux donnerait alors lieu à l'apparition de nanoparticules ou nanopiliers bimétalliques à l'intérieur des pores de l'auto-assemblage. Il a été montré par Huang et al.<sup>326</sup> que l'utilisation de nanoparticules cœur/coquille cuivre/or permet d'augmenter le signal d'un biocapteur basé sur l'électrochimiluminescence aboutissant à la détection de pesticides organophosphorés. Dans un tout autre domaine d'application, Shang et al.<sup>327</sup> ont, quant à eux, développé des nanoparticules cuivre/or sans domaines distincts cœur/coquille capables de réduire spécifiquement le  $CO_2$  en acide formique (HCOOH), seul produit valorisable en chimie.

Par ailleurs, l'obtention de nanostructures métalliques à partir de séquences peptidiques optimisées a été décrite dans la littérature. Par exemple, le groupe de Hur<sup>328</sup> a optimisé la séquence peptidique suivante TGTSVLIATPGV créant ainsi le peptide Midas-11 qui est capable de chélater les ions Au<sup>3+</sup> spécifiquement. Dans un autre travail, Munro et Knecht<sup>329</sup> ont créé un peptide AuBP1, WAGAKRLVLRRE, pouvant lui aussi chélater les ions Au<sup>3+</sup>. La présence d'un tryptophane dans la séquence d'AuBP1 lui confère des propriétés autocatalytiques lorsqu'il est dans un milieu ayant un pH acide. Que ce soit pour Midas-11 ou pour AuBP1, les ions Au<sup>3+</sup> sont réduits *in situ* sans apport externe d'un réducteur comme le NaBH<sub>4</sub> permettant de simplifier la création de nanostructures métalliques. Ces deux séquences peptidiques étant courtes et leurs propriétés de chélation et de réduction des sels d'or intéressantes, elles ont constitué la seconde approche dans le design des mutants. Ces séquences ont été intégrées en tant que partie C-terminale dans deux autres mutants (Tableau 3.2).

Nom de la protéine	Séquence de la partie C- terminale
GbLFY-SAM <sub>Midas-11</sub>	KKGGSTGTSVLIATPGV
GbLFY-SAM <sub>AuBP1</sub>	KKGGWAGAKRLVLRRE

**Tableau 3.2 :** Séquences en acide aminé des peptides de la littérature utilisés comme partie C- terminale dans les mutants de GbLFY-SAM.

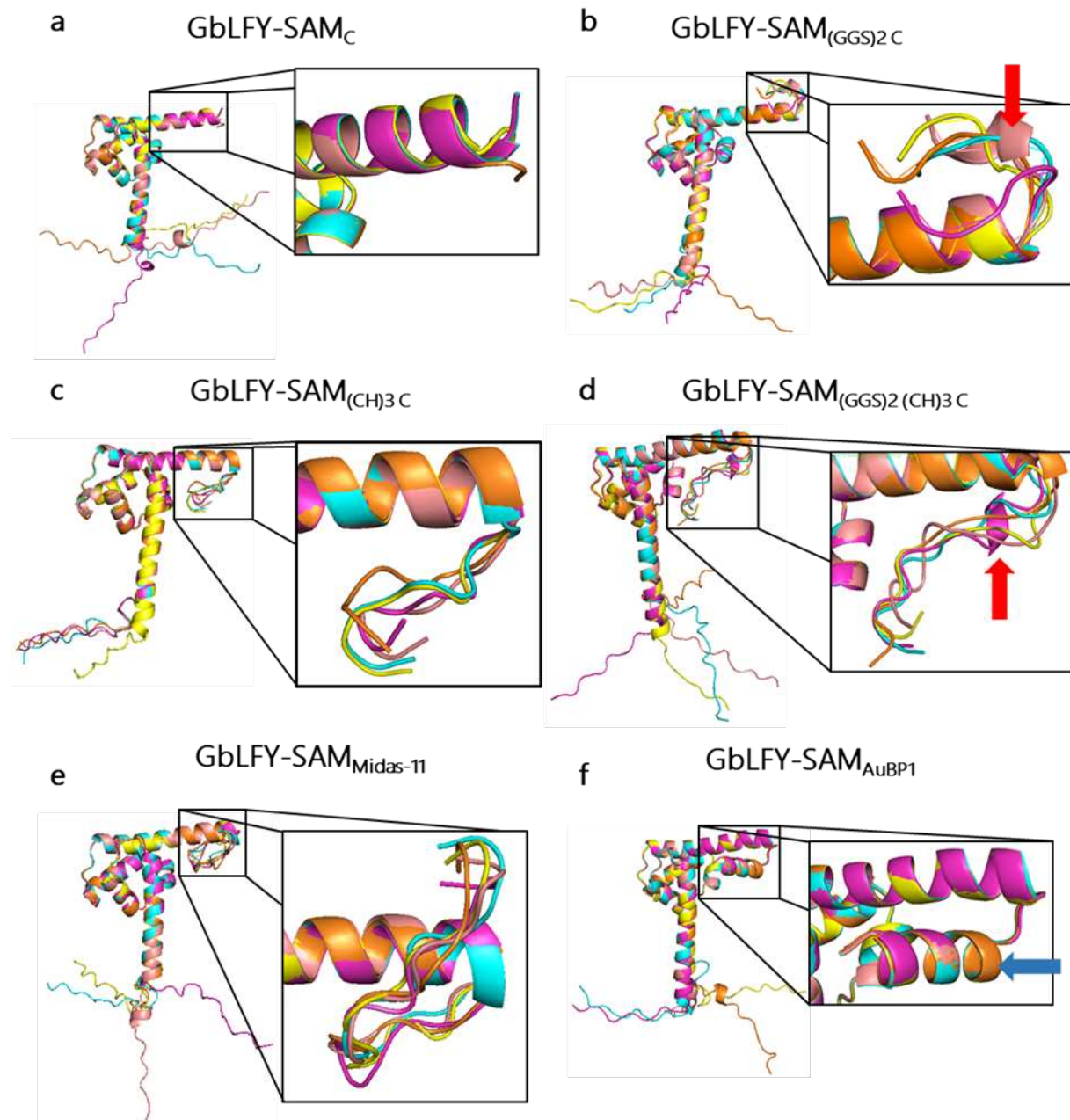
### 3.1.2 Structures tertiaires des mutants par modélisation

L'addition et/ou la mutation d'acide aminé dans la séquence d'une protéine n'est jamais anodine et peut parfois aboutir à une perte de fonction. Ici, la partie C- terminale de GbLFY-SAM est flexible. Or, le fait de changer tout ou une partie de la séquence de celle-ci pourrait entraîner soit la création de structures rigides comme des hélices  $\alpha$  ou des feuillets  $\beta$ , soit une modification des liaisons faibles médiées par cette partie C- terminale pouvant avoir des conséquences importantes dans la formation, *a posteriori*, de la structure en nid d'abeille. Pour confirmer l'innocuité des modifications apportées à GbLFY-SAM sur sa capacité de formation du nid d'abeille, nous devons déterminer la structure tertiaire des mutants créés. Déterminer la structure d'une protéine peut se faire de diverses manières la plus courante étant l'utilisation de la diffraction aux rayons X sur des cristaux protéiques 3D. La résonance magnétique nucléaire ainsi que la cryo-microscopie électronique peuvent aussi être envisagées. Le problème de ces trois techniques est leur caractère chronophage pouvant nécessiter quelques semaines à quelques mois avant d'obtenir des résultats.

Le choix de la technique pour obtenir la structure tertiaire des mutants s'est alors porté sur la modélisation en utilisant le programme de prédiction RosettaFold sur le serveur web Robetta. Cet outil permet de déterminer un modèle de la structure de la protéine d'intérêt en utilisant notamment des méthodes basées sur le *deep learning*<sup>330</sup>. La séquence de la protéine est découpée en morceaux puis chaque morceau est comparé à des séquences connues de la PDB pour en déduire le repliement dans l'espace de ces morceaux. Ils sont par la suite recombinaisonnés pour aboutir à la structure tertiaire de la protéine. Les prédictions de ce serveur web aboutissent à la création de 5 modèles PDB ayant chacun un score de confiance global (de 0 : peu fiable à 1 : fiable) qui détermine la robustesse du modèle de la structure de la protéine d'intérêt. Cette modélisation donne aussi accès à une estimation de l'erreur au niveau de chaque acide aminé. Cette estimation est en réalité une distance, en Å, qui permet de déterminer à quel point le

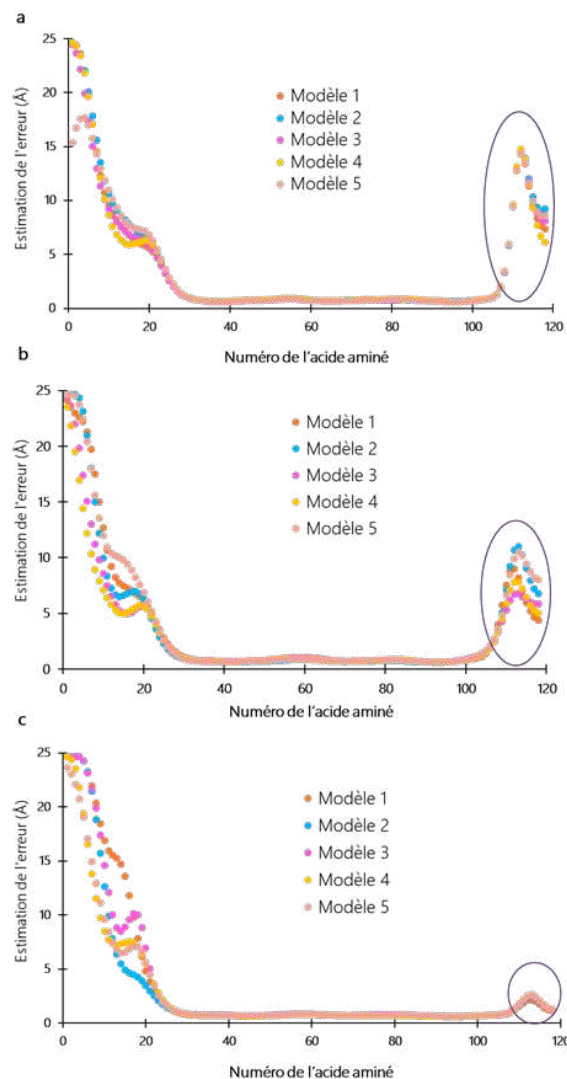
positionnement de l'acide aminé correspond à la réalité. Autrement dit, plus cette distance est petite, plus la position de l'acide aminé dans l'espace sera fiable. Le temps d'obtention de ces modèles varie en fonction de la longueur de la séquence protéique mais dure généralement quelques jours.

Pour chaque mutant de la partie C- terminale de GbLFY-SAM, l'ensemble de sa séquence protéique (c'est-à-dire la partie N- terminale, le cœur de la protéine et la partie C- terminale) a été soumise aux prédictions de Robetta. Pour chaque mutant, les cinq modèles ont été superposés pour comparer les prédictions de structure secondaires des 5 modèles. Les superpositions sont présentées dans la Figure 3.1.



**Figure 3.1 :** Visualisation en style « cartoon » de la superposition des modèles construits par deep learning pour chaque mutant. Ce style permet d'apprécier les structures secondaires (hélices  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ , random coil) des protéines. Chaque couleur (orange, bleu, fuchsia, jaune et rose) est associée l'un des cinq modèles. Les encadrés représentent un zoom sur la partie C- terminale.

Pour les mutants GbLFY-SAM<sub>C</sub>, GbLFY-SAM<sub>(CH)<sub>3</sub>C</sub> et GbLFY-SAM<sub>Midas-11</sub> (Figure 3.1.a, c et e), le remplacement de la partie C-terminale n'aboutit pas à la formation de structures secondaires spécifiques. Pour GbLFY-SAM<sub>(GGS)<sub>2</sub>C</sub> et GbLFY-SAM<sub>(GGS)<sub>2</sub>(CH)<sub>3</sub>C</sub> (Figure 3.1.b et d) un des 5 modèles prédit une petite partie en hélice  $\alpha$  (flèches rouges). Cependant, les 4 autres modèles de ces mutants ne prédisant pas ce type de structure. Lorsque nous regardons les graphiques qui correspondent à l'estimation de l'erreur de positionnement local pour chaque acide aminé (Figure 3.2.a et b), les acides aminés de la partie C-terminale (entourés en violet) divergent entre 5 et 10 Å quel que soit le modèle que nous regardons. Cela signifie qu'au niveau de la partie C-terminale, il n'y a pas un modèle meilleur que les autres et que, pour ces deux mutants, la partie C-terminale est probablement désordonnée. Dans le cas de GbLFY-SAM<sub>AuBP1</sub>, (Figure 3.1.e) tous les modèles prédisent une partie C-terminale qui aboutirait à la formation d'une hélice  $\alpha$  (flèche bleue). Dans le graphique de l'estimation de l'erreur de positionnement (Figure 3.2.c), les acides aminés de la partie C-terminale sont en dessous de 3 Å ce qui appuie le fait que cette séquence aboutirait bien à la création d'une hélice  $\alpha$ .



**Figure 3.2 :** Graphique de l'estimation de l'erreur de positionnement pour chaque acide aminé des mutants GbLFY-SAM<sub>(GGS)<sub>2</sub>C</sub> (a) GbLFY-SAM<sub>(GGS)<sub>2</sub>(CH)<sub>3</sub>C</sub> (b) et GbLFY-SAM<sub>AuBP1</sub> (c). Plus l'erreur est faible plus la prédiction concernant l'acide aminé est fiable. Les cercles violets indiquent les acides aminés de la partie C-terminale.

D'une manière générale, l'utilisation de la modélisation nous permet de prédire que le remplacement de cette partie C- terminale aboutit à la formation de structures flexibles. Il est important de garder à l'esprit que malgré cette flexibilité, l'auto-assemblage peut être perturbé car nous changeons les charges de la partie C- terminale ce qui peut modifier les interactions ioniques ou hydrogènes dans lesquelles elle est impliquée.

### 3.1.3 Production et purification des mutants

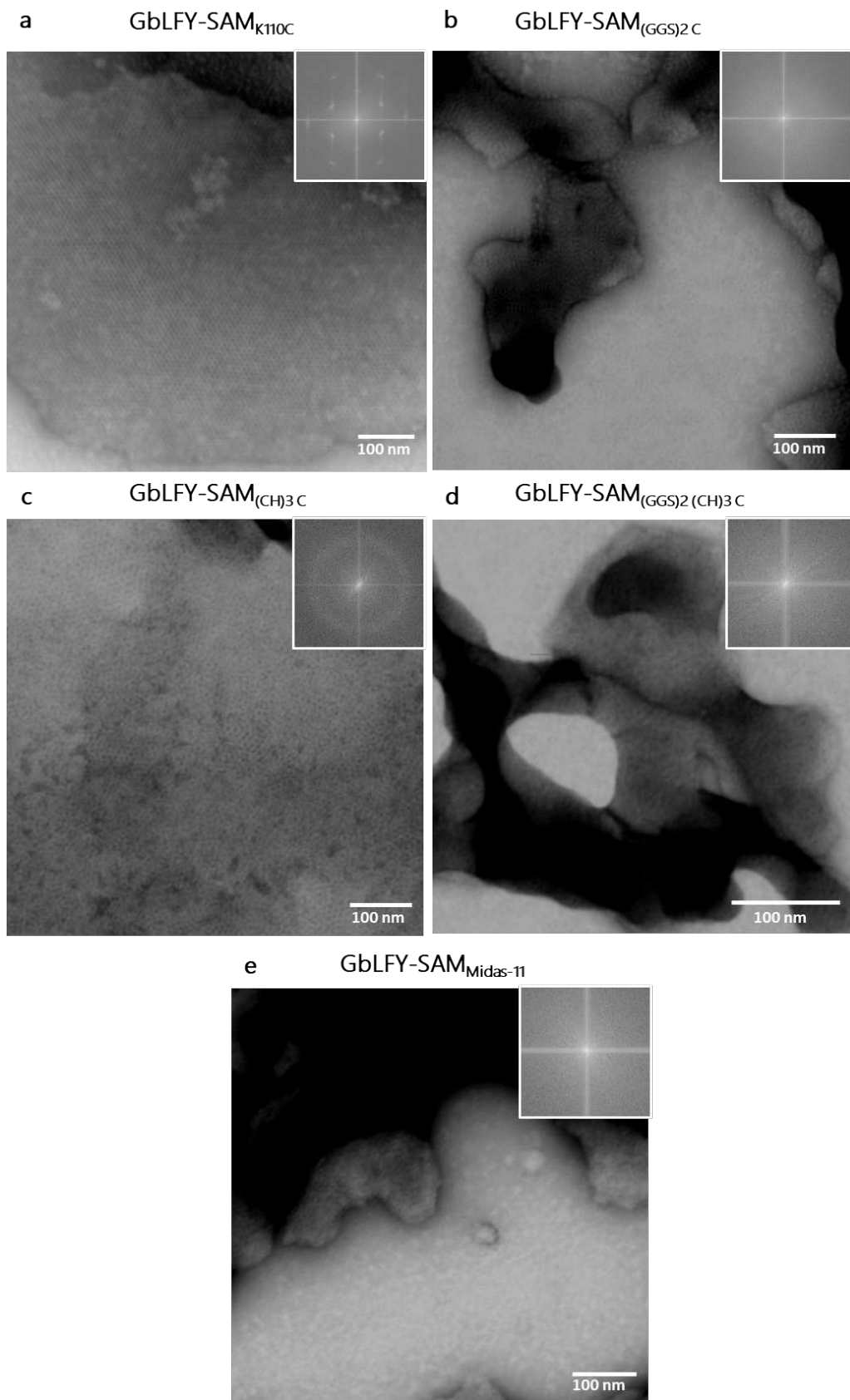
A l'instar de GbLFY-SAM, les mutants ont été obtenus par surproduction dans des bactéries compétentes. L'ADN codant pour chaque mutant a ainsi été modifié pour enlever la partie codante pour les 24 acides aminés de la partie C- terminale et remplacer cette dernière par la séquence ADN correspondante aux séquences en acide aminé décrites dans les tableaux 3.1 et 3.2. Le protocole de production est resté inchangé. En revanche, pour tous les mutants sauf GbLFY-SAM<sub>K110C</sub>, il a été nécessaire de modifier les conditions de purification. Le fait de modifier la partie C- terminale entraîne une augmentation des capacités d'oligomérisation des mutants en solution. Cela se traduit par l'insolubilité de ces protéines dans le tampon classiquement utilisé lors des purifications de GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> et GbLFY-SAM. Le problème étant la trop forte interaction entre les mutants, le tampon classique a été remplacé par un tampon contenant du CAPS, une molécule zwitterionique présentant un pKa de 10,4 et une région hydrophobe, ainsi que du NaCl. Ces changements permettent de neutraliser les charges mais aussi les régions hydrophobes autour des mutants pour empêcher leur interaction et ainsi augmenter leur solubilité. Le résultat de ces purifications est analysé par des gels SDS-PAGE et est présenté dans les annexes (Figure 7.1). Il est à noter que sur les sept mutants évoqués dans la section 3.1, seuls 5 mutants ont bien été produits. Pour les deux restants, GbLFY-SAM<sub>AuBP1</sub> et GbLFY-SAM<sub>C</sub>, l'induction de l'expression des protéines n'a pas permis d'obtenir une production.

### 3.1.4 Auto-assemblage des mutants

#### 3.1.4.1 Utilisation des mêmes conditions que GbLFY-SAM

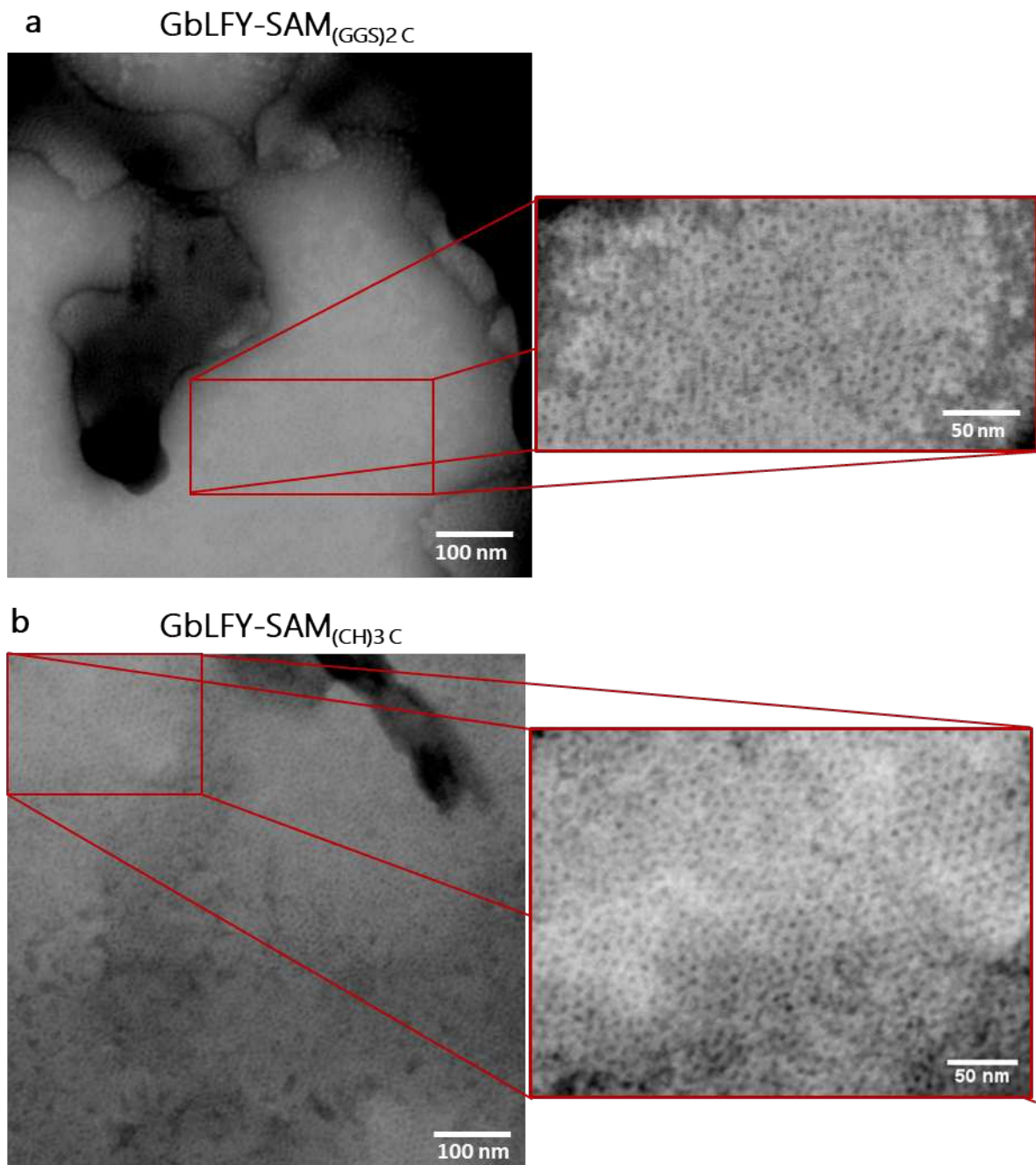
La modélisation de la structure tertiaire des mutants présentée en section 3.1.2 a montré que les séquences en acide aminé insérées n'ont pas de structure secondaire particulière. Nous pouvons ainsi supposer qu'en utilisant exactement les mêmes conditions d'auto-assemblage que pour GbLFY-SAM, les mutants devraient former la structure en nid d'abeille. Pour chaque mutant produit, sa capacité d'auto-assemblage a été testée dans le tampon 315 mM de sulfate d'ammonium / 20 mM Tris-HCl / 1 mM TCEP.

L'image Figure 3.3.a montre que GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> est capable de former des auto-assemblages similaires à GbLFY-SAM. L'utilisation de la FFT sur l'image STEM permet aussi de déterminer que les paramètres de maille de ces auto-assemblages sont  $a = b = 8,4 (+/-0,2)$  nm et  $\gamma = 120 (+/-8)^\circ$ ;  $a$  et  $b$  décrivent sa taille dans deux directions de l'espace et  $\gamma$  traduisant l'angle d'éloignement entre ces deux axes. Ces dimensions sont en accord avec celles de l'auto-assemblage de GbLFY-SAM qui sont  $a = b = 8.2 (+/-0.1)$  nm et  $\gamma = 120 (+/-1)^\circ$ . Dans le cas des mutants GbLFY-SAM<sub>(GGG)<sub>2</sub>(CH)<sub>3</sub>C</sub> et GbLFY-SAM<sub>Midas-11</sub>, les FFT ne révèlent la présence d'aucun motif particulier sur les images.



**Figure 3.3 :** Images STEM des auto-assemblages mutants de GbLFY-SAM après coloration à l'acétate d'uranyle dans le tampon d'auto-assemblage suivant : 20 mM Tris-HCl pH 8,0 / 315 mM sulfate d'ammonium / 1 mM TCEP.

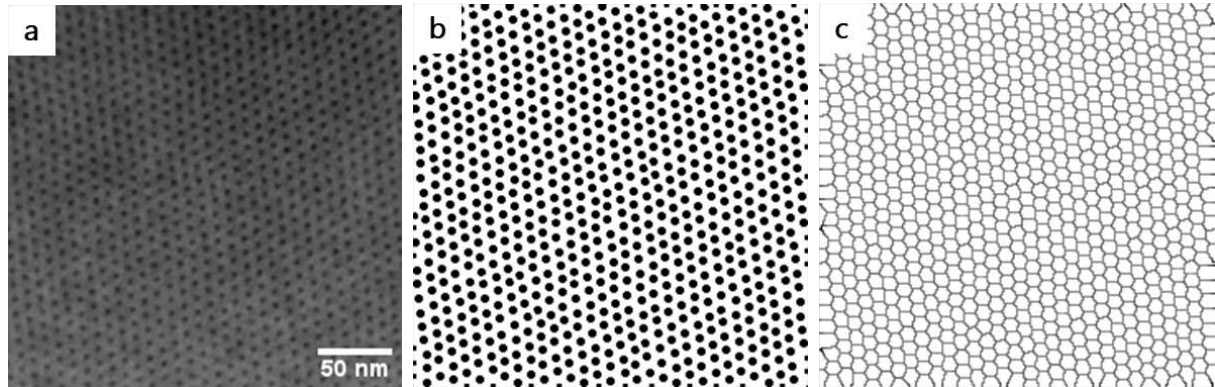
En revanche, pour GbLFY-SAM<sub>(GGS)2 C</sub> et pour GbLFY-SAM<sub>(CH)3 C</sub>, il y a apparition d'un cercle de fréquences qui correspond à un motif dont les distances se situeraient entre 8 et 10 nm. Ceci pourrait correspondre aux distances de la maille de l'auto-assemblage. En augmentant les contrastes sur les images, il apparaît dans le fond des points noirs qui correspondraient aux pores des nids d'abeille (Figure 3.4).



**Figure 3.4 :** Augmentation des contrastes et zoom sur une petite partie des images STEM des auto-assemblages mutants de GbLFY-SAM<sub>(GGS)2 C</sub> (a) et GbLFY-SAM<sub>(CH)3 C</sub> (b) déjà présentées en Figure 3.3. Sur ces zooms apparaissent des points noirs organisés qui semblent par endroit former la structure en nid d'abeille.

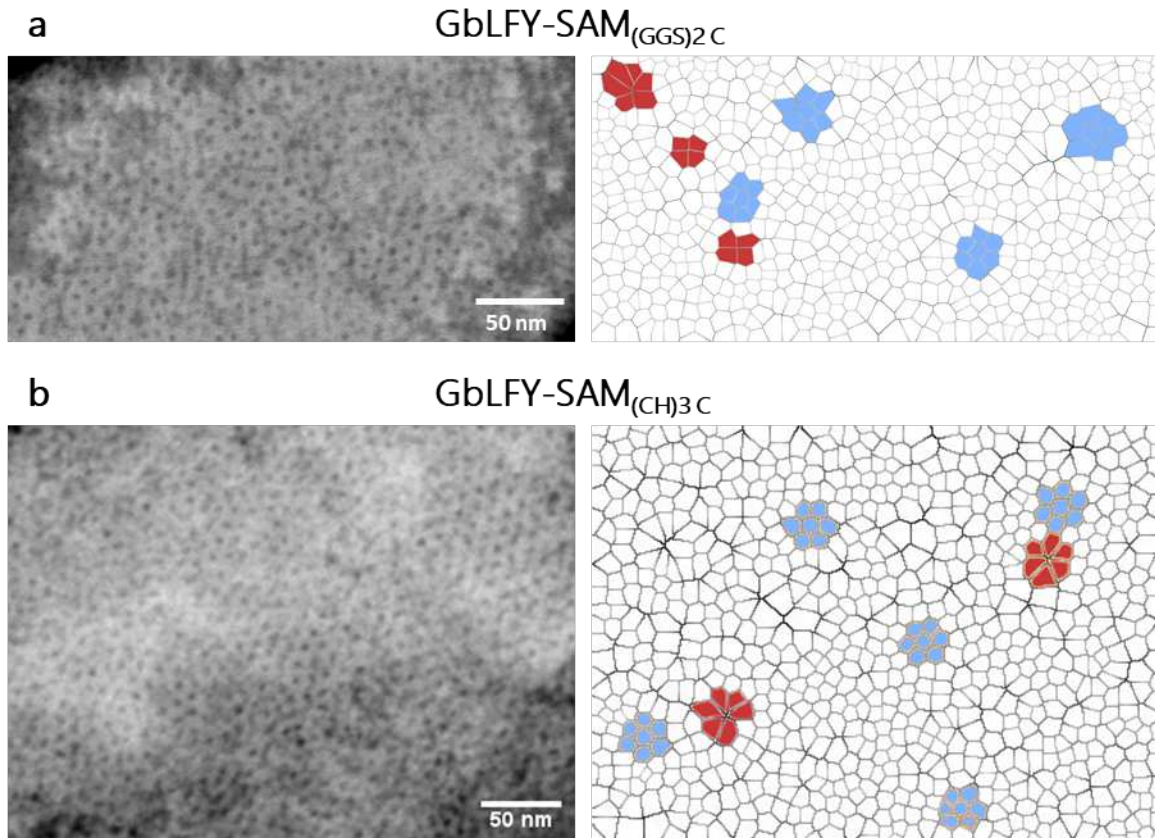
Afin de s'assurer que ces points noirs correspondent bien aux pores des nids d'abeille et non à un bruit de fond quelconque, un traitement d'image a été réalisé. L'outil choisi ici est le

découpage de l'image pour construire un diagramme de Voronoi. A partir d'un ensemble de points sur une image, ce découpage permet de créer un polygone contenant chaque point. Le nombre de côtés du polygone dépend du nombre de voisins du point contenu dans le polygone. Dans le cas d'un motif parfaitement construit comme c'est le cas pour l'auto-assemblage de GbLFY-SAM (Figure 3.5.a et b), chaque point correspondant au pore d'une hélice supramoléculaire des auto-assemblages sera contenu dans un hexagone (Figure 3.5.c).



**Figure 3.5 :** Image STEM de l'auto-assemblage GbLFY-SAM (a) ainsi que le résultat du traitement de cette image pour faire ressortir uniquement les pores de l'auto-assemblage (b). A partir de ce traitement d'image, il est créé le diagramme de Voronoi correspondant (c) qui est une juxtaposition d'hexagones traduisant la formation complète de la structure en nid d'abeille.

Cette manière de découper les motifs d'une image permet aussi d'avoir une appréciation visuelle des défauts qu'il peut y avoir dans une structure 2D<sup>331</sup>. La déduction des diagrammes de Voronoi des images STEM des deux mutants GbLFY-SAM<sub>(GG5)2 C</sub> et GbLFY-SAM<sub>(CH)3 C</sub> (Figure 3.6) met en lumière que certains nids d'abeille sont bien formés et complets (un hexagone entouré de six autres hexagones, en bleu) tandis que d'autres ne le sont pas (en rouge). Par exemple, il peut manquer un hexagone au centre ce qui aboutit à une forme en pétale de fleur pour les voisins (Figure 3.6.b à droite). D'un point de vue de l'auto-assemblage, lorsqu'un hexagone est manquant cela signifie que l'hélice supramoléculaire correspondante n'a pas été formée. Dans le cas de ces deux mutants, le diagramme de Voronoi n'aboutit pas à une succession régulière d'hexagone ce qui montre que la croissance des auto-assemblages est incomplète. Sur les FFT, ces imperfections aboutissent une multiplication des fréquences rencontrées et donc à l'apparition du cercle.



**Figure 3.6 :** Zooms des images STEM des mutants (à gauche) déjà montrés en Figure 3.3 et diagramme de Voronoi associé (à droite). Ces diagrammes permettent de mieux visualiser les nids d'abeille complets (en bleu) et ceux qui sont incomplets (en rouge). Pour des questions de clarté, tous les nids d'abeille qu'ils soient complets ou non n'ont pas été colorés.

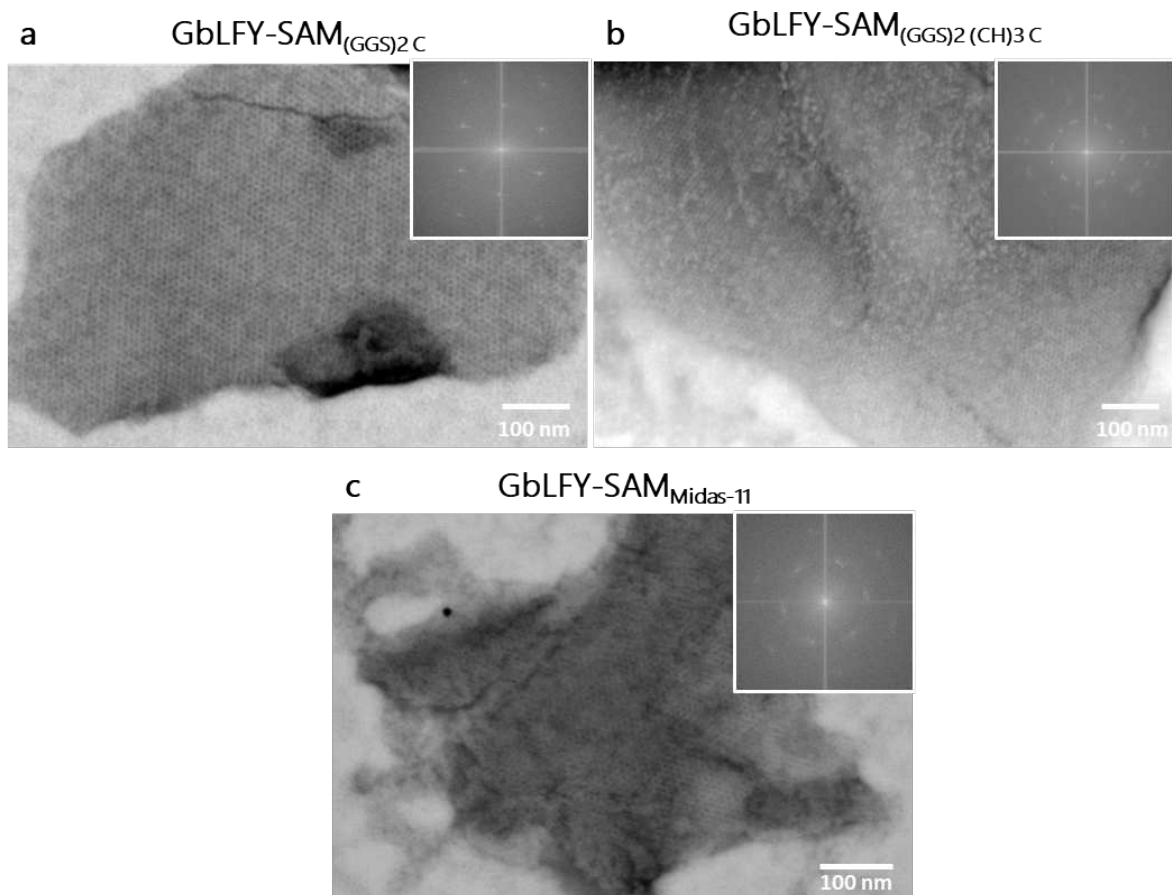
Ces analyses d'images permettent d'affirmer qu'il est possible d'obtenir des auto-assemblages en utilisant les mutants GbLFY-SAM<sub>(GGS)<sub>2</sub>C</sub> et GbLFY-SAM<sub>(CH)<sub>3</sub>C</sub>. Dans le but d'améliorer l'auto-assemblage des mutants, des variations de concentrations en sulfate d'ammonium, en TCEP mais aussi un changement total de tampon comme l'utilisation d'un tampon HEPES pH 7,0 ou de sulfate de lithium ont été testés. Ces tampons d'auto-assemblages ont été choisis car ils permettent à la base d'obtenir des cristaux de GbLFY-SAM en solution. La liste complète des tampons d'auto-assemblage testés est décrite dans le tableau 6.3 (Matériel et Méthodes). Tous les mutants produits et purifiés ont été testés dans ces conditions. Ces tests n'ont pas abouti au résultat escompté ; les auto-assemblages mutants restent difficilement observables.

#### 3.1.4.2 Echange du tampon de purification des mutants

Le fait que les mutants ne s'auto-assemblent pas ou mal dans les conditions présentées ci-dessus peut être dû à la composition du tampon dans lequel les mutants sont purifiés. En effet, pour pallier leur propension à fortement oligomériser, le tampon de purification est composé de 0,2 M de CAPS-NaOH pH 10,5 / 0,5 M NaCl / 1 à 5 mM TCEP. L'utilisation du CAPS-NaOH et du NaCl permet de neutraliser les charges et les régions hydrophobes des mutants afin de les empêcher d'interagir entre eux et de les rendre solubles. Ceci peut modifier, par la suite, leur capacité à s'auto-assembler même dans des conditions considérées comme favorables. Le remplacement des tampons a été effectué en réalisant des chromatographies d'exclusion stérique (*Steric Exclusion Chromatography*, SEC). Ainsi les concentrations en CAPS-NaOH et en NaCl ont

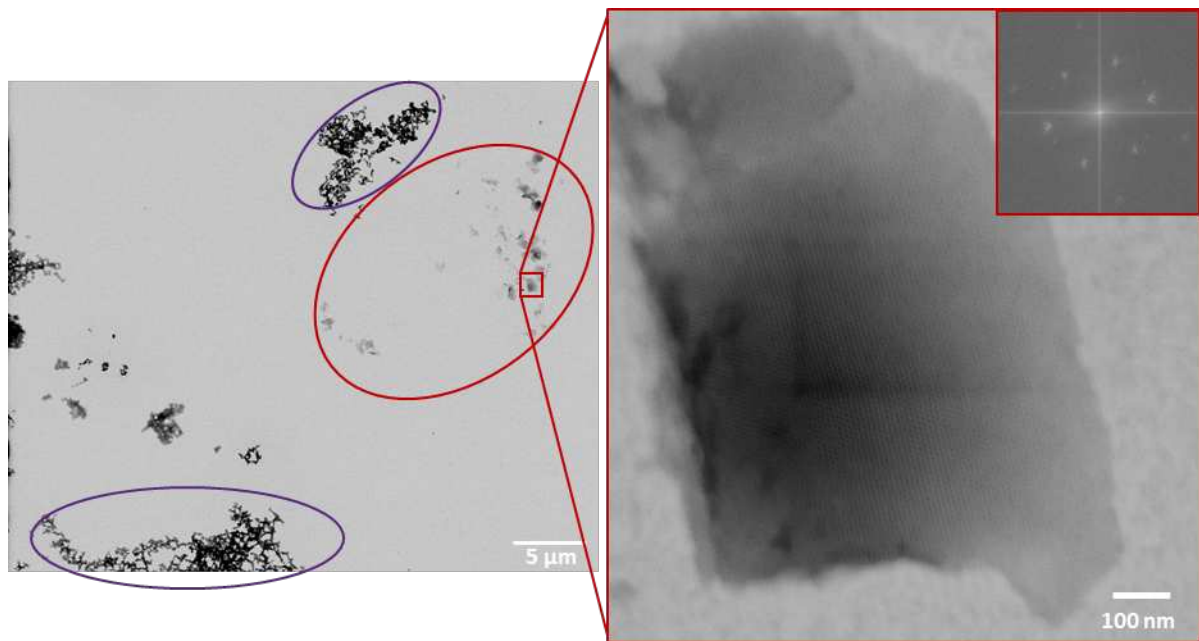
été diminuées jusqu'à 40 mM et 50 mM respectivement. Ce changement de tampon a été réalisé pour les mutants GbLFY-SAM<sub>(GGG)<sub>2</sub>C</sub>, GbLFY-SAM<sub>(GGG)<sub>2</sub>(CH)<sub>3</sub>C</sub> et GbLFY-SAM<sub>Midas-11</sub>. Les profils des chromatogrammes sont présentés dans les annexes (Figure 7.2 et 7.3).

Les tests d'auto-assemblage ont été à nouveau réalisés, en balayant le même panel de tampon que précédemment, et le résultat de ces tests est présenté en Figure 3.7. Dans le cas des trois mutants, des auto-assemblages se sont formés. Les FFT des images montrent des fréquences caractéristiques et les paramètres de maille déduits sont identiques à ceux de GbLFY-SAM. Il est à noter que les conditions d'auto-assemblage ne sont pas identiques dans les trois cas, ce qui ne permet pas d'identifier un unique tampon dans lequel tous les mutants s'auto-assembleraient. Il apparaît alors que le changement de tampon de purification n'est pas suffisant pour aboutir à la formation des auto-assemblages des mutants. Il semble nécessaire de combiner ce changement avec une optimisation du tampon d'auto-assemblage.



**Figure 3.7 :** Images STEM des auto-assemblages mutants de GbLFY-SAM après échange de tampon par SEC. Les conditions d'auto-assemblage sont **a.** 20 mM Tris-HCl pH 8,0 / 315 mM sulfate d'ammonium / 5 mM TCEP. **b.** 50 mM HEPES pH 7,0 / 315 mM sulfate de lithium / 10 mM TCEP. **c.** 20 mM Tris-HCl pH 8,0 / 75 mM sulfate d'ammonium / 1 mM TCEP. Les auto-assemblages ont été marqués à l'acétate d'uranyle.

Malgré les différentes optimisations de tampon de purification ou d'auto-assemblage, les images présentées dans la Figure 3.7 ne sont pas les formes majoritairement retrouvées lors de la visualisation des auto-assemblages mutants. La Figure 3.8 montre une vue d'un champ large en STEM d'une grille de microscopie sur laquelle GbLFY-SAM<sub>(GGG)<sub>2</sub>C</sub> s'est auto-assemblé.



**Figure 3.8 :** Exemple des différentes populations d'auto-assemblages rencontrées lors de visualisation des mutants. Ce sont des images STEM obtenues après auto-assemblage de GbLFY-SAM<sub>(GGG)<sub>2</sub>C</sub> et marquage à l'acétate d'uranyle. En violet sont entourés les auto-assemblages qui sont empilés. En rouge sont entourés les auto-assemblages étant identiques à ceux de GbLFY-SAM. Un exemple de ces auto-assemblages bien formés est montré sur le zoom à droite.

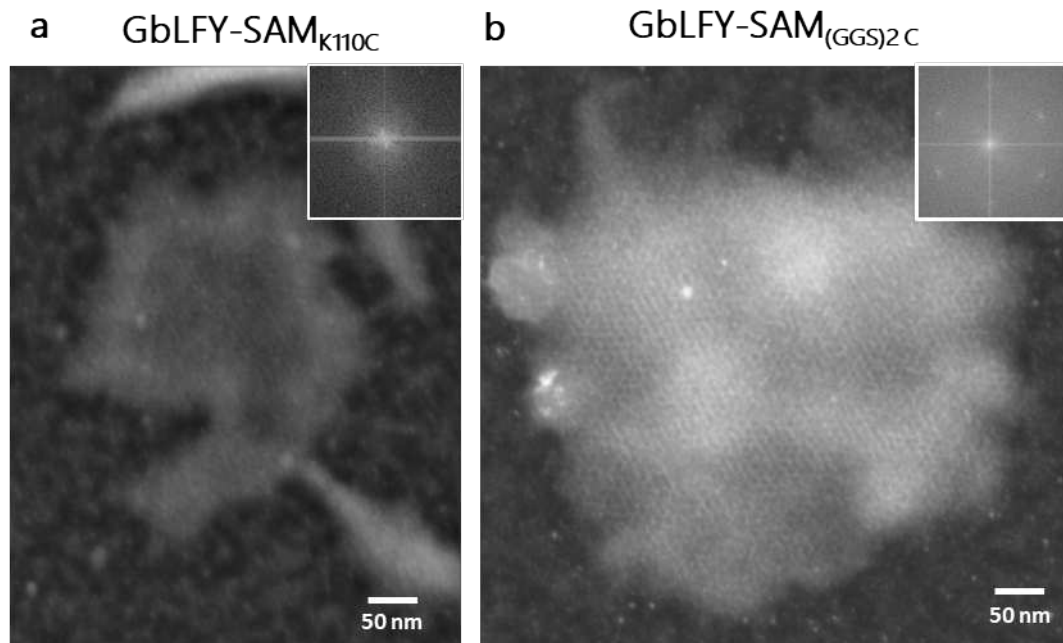
Les formes entourées en violet représentent un empilement de protéines comme déjà visualisé dans la Figure 3.3.b, d et e. Les formes entourées en rouge sont toutes identiques au zoom de cette même Figure. Elles représentent des nids d'abeilles parfaitement formés et identiques à ceux de GbLFY-SAM. Ces expériences montrent qu'il est possible d'obtenir des auto-assemblages mutants identiques à GbLFY-SAM pouvant atteindre des tailles d' $1 \mu\text{m}^2$  mais ils restent minoritaires sur la surface ce qui aboutit à des problèmes de répétabilité.

## 3.2 Stratégies de métallation des nids d'abeille pour la création de nanopiliers d'or

### 3.2.1 Par l'utilisation d'ions $\text{Au}^{3+}$

La fonctionnalisation des auto-assemblages par les ions  $\text{Au}^{3+}$  implique d'abord l'auto-assemblage des protéines sur la grille de microscopie puis une étape de mise en contact avec les ions avant une étape finale de réduction de ceux-ci par le  $\text{NaBH}_4$ . Sur l'auto-assemblage GbLFY-SAM, nous avons montré que les ions  $\text{Au}^{3+}$  se chélatent de manière préférentielle sur le contour des pores (Figure 6.d de l'article Chapitre 2). En utilisant les mêmes conditions de réaction que pour GbLFY-SAM, la fonctionnalisation des auto-assemblages mutants GbLFY-SAM<sub>K110C</sub>, GbLFY-SAM<sub>(GGG)<sub>2</sub>C</sub>, GbLFY-SAM<sub>(GGG)<sub>2</sub>(CH)<sub>3</sub>C</sub> et GbLFY-SAM<sub>Midas-11</sub> a été testée. L'insertion d'une ou plusieurs cystéines à l'intérieur des pores du nid d'abeille ou l'utilisation d'une séquence peptidique optimisée devrait permettre la chélation des ions  $\text{Au}^{3+}$  à l'intérieur des pores et non sur le contour. Il est essentiel de retenir que le contraste dans les images STEM présentées ci-après n'est dû qu'à la présence de l'or réduit. Autrement dit, dans ces échantillons il n'y a pas de produits contrastants comme l'acétate d'uranyle ou l'osmium. Dans le cas du mutant GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> (Figure 3.9.a), il n'y a pas de fonctionnalisation spécifique à l'intérieur ou à l'extérieur des pores. Il apparaît alors que la métallation du mutant GbLFY-SAM<sub>(GGG)<sub>2</sub>C</sub> devrait aboutir à la même fonctionnalisation que

GbLFY-SAM<sub>K110C</sub>. La Figure 3.9.b montre la fonctionnalisation d'un auto-assemblage de GbLFY-SAM<sub>(GGS)2C</sub> avec de l'or réduit. Il a été surprenant de constater que cette fonctionnalisation aboutit au même marquage que GbLFY-SAM (marquage du tour de l'auto-assemblage uniquement).

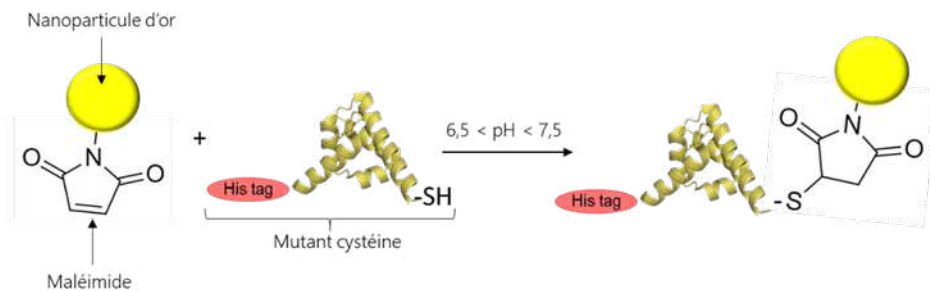


**Figure 3.9 :** Métallation des mutants (a) et GbLFY-SAM<sub>(GGS)2C</sub> (b) par chélation des ions Au<sup>3+</sup> puis réduction de ceux-ci par le NaBH<sub>4</sub>. Le contraste des images est uniquement apporté par l'or réduit. Le marquage apparaît blanc au lieu de noir comme montré précédemment car le détecteur STEM utilisé ici est le détecteur dark field.

La présence d'une seule cystéine ne permet pas de chélater les ions Au<sup>3+</sup> à l'intérieur des pores. Dans le cas du mutant GbLFY-SAM<sub>(GGS)2C</sub>, le marquage du contour pourrait être dû au fait que la cystéine se trouve très proche de la paroi interne des pores et donc pas forcément très accessible. Dans le cas du mutant GbLFY-SAM<sub>K110C</sub>, la conclusion sur sa métallation n'est pas évidente car il n'y a pas un motif unique de marquage (intérieur ou extérieur des pores) qui domine. Pour les mutants GbLFY-SAM<sub>(GGS)2(CH)3C</sub> et GbLFY-SAM<sub>Midas-11</sub>, les auto-assemblages formés sont difficilement obtenables même dans les conditions favorables : il n'y a quasiment que les formes empilées (entourées en violet sur la Figure 3.8) qui sont retrouvées sur la surface. Ceci n'a pas permis l'observation de la métallation de ces auto-assemblages mutants.

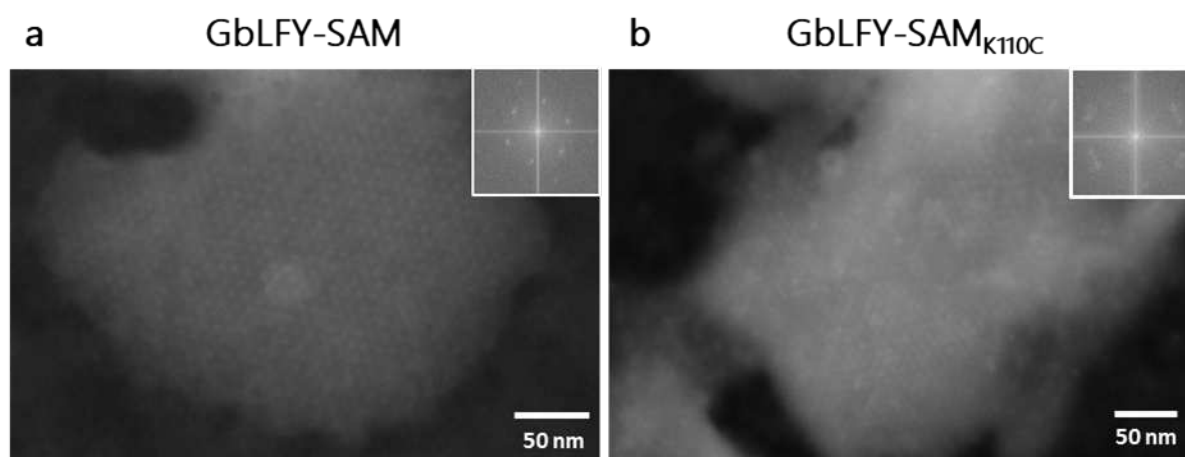
### 3.2.2 Par le greffage de nanoparticules d'or

L'utilisation des cystéines pour diriger la chélation des ions  $\text{Au}^{3+}$  à l'intérieur ne semble pas être suffisante. Aboutir à des nanostructures de types nanopiliers par l'unique biais des ions  $\text{Au}^{3+}$  apparaît alors comme étant un vrai défi. Par ailleurs, l'utilisation de points d'ancrage métalliques, comme des nanoparticules, permet de favoriser *a posteriori* la chélation d'ions métalliques au niveau de ces points d'ancrage. Appliquée aux nanostructures en nid d'abeille étudiées dans cette thèse, il y aurait une première étape de greffage covalent de nanoparticules en or dans les pores de l'auto-assemblage par le biais des fonctions thiol des cystéines. La seconde étape serait identique à celle décrite dans la section 3.2.1, c'est-à-dire une mise en contact des auto-assemblages avec les ions  $\text{Au}^{3+}$  puis une réduction de ces ions grâce au  $\text{NaBH}_4$  toujours dans l'optique de créer des nanopiliers d'or. Le choix des nanoparticules s'est porté sur des nanoparticules d'or commerciales comportant un groupement maléimide. Ce groupement réagit spécifiquement avec la fonction thiol des cystéines selon la réaction présentée Figure 3.10. La taille des nanoparticules est de 2 nm ce qui devrait être suffisant pour pouvoir pénétrer à l'intérieur des pores des auto-assemblages (5 nm de diamètre) pour accéder aux fonctions thiols.



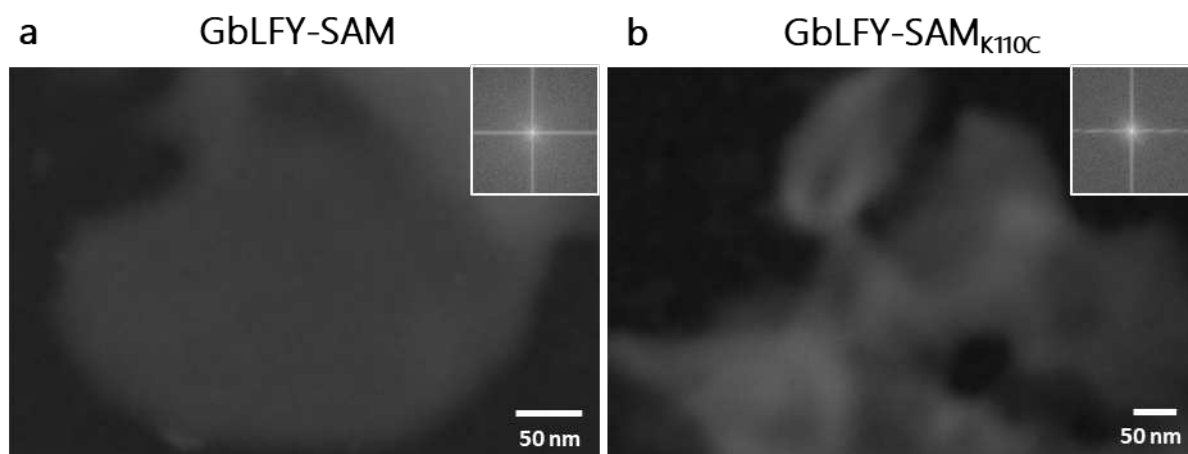
**Figure 3.10 :** Fonctionnalisation théorique des mutants cystéines avec les nanoparticules commerciales.

Les expériences de greffage des nanoparticules ont tout d'abord été réalisées avec GbLFY-SAM, le contrôle, et GbLFY-SAM<sub>K110C</sub>. Après l'étape d'auto-assemblage sur la grille de microscopie, les auto-assemblages sont mis en contact pendant 1h30 avec une solution contenant les nanoparticules fonctionnalisées avec un maléimide. Dans ces expériences, les nanoparticules ne sont pas réduites par la suite. La Figure 3.11 montre les images STEM du greffage des nanoparticules. Tout comme dans les expériences de la section 3.2.1, le contraste dans les images STEM est dû uniquement à la présence des nanoparticules d'or.



**Figure 3.11 :** Fonctionnalisation des auto-assemblages GbLFY-SAM (a) et GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> (b) par des nanoparticules d'or d'un diamètre de 2 nm fonctionnalisées avec un maléimide. Le contraste des images est uniquement apporté par ces nanoparticules. Le marquage apparaît blanc au lieu de noir car le détecteur STEM utilisé ici est le détecteur dark field.

Que ce soit dans le cas des auto-assemblages créés à partir GbLFY-SAM (Figure 3.11.a) ou de GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> (Figure 3.11.b), les pores des auto-assemblages apparaissent marqués par les nanoparticules. De prime abord, il n'y a pas de greffage spécifiquement apporté par l'ajout de la cystéine. Cependant, il est possible, dans le cas des auto-assemblages GbLFY-SAM, que les nanoparticules d'or ne soient pas greffées de manière covalente mais qu'elles soient simplement adsorbées dans les pores. Pour tester cette hypothèse, les auto-assemblages fonctionnalisés avec les nanoparticules ont été par la suite rincés avec de l'eau MilliQ. Les images correspondantes sont présentées en Figure 3.12.



**Figure 3.12 :** Visualisation des auto-assemblages GbLFY-SAM (a) et GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> (b) après greffage des nanoparticules d'or puis rinçage à l'eau. Le détecteur STEM utilisé ici est aussi le détecteur dark field.

Dans les deux cas, les pores des auto-assemblages ne sont plus visibles et les FFT ne montrent plus aucune fréquence caractéristique. Le rinçage des auto-assemblages avec de l'eau a fait se désorber les nanoparticules d'or. Il en découle que pour les auto-assemblages GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> les nanoparticules d'or ne sont pas greffées de manière covalente malgré la présence de la cystéine. A cette position, la cystéine est très proche du cœur de la protéine et est entourée des autres acides aminés de la partie C- terminale ce qui pourrait modérer la réactivité de la cystéine

par exemple par un phénomène d'augmentation de pH local. Cette hypothèse d'accessibilité peut notamment être testée en fonctionnalisant les auto-assemblages des mutants GbLFY-SAM<sub>(GGG)<sub>2</sub>C</sub> et GbLFY-SAM<sub>(GGG)<sub>2</sub>(CH)<sub>3</sub>C</sub>. A nouveau, du fait de la fragilité des auto-assemblages mutants, les tests réalisés sur ceux-ci sont restés sans réponse. Les auto-assemblages empilés ne présentaient pas de marquage spécifique et les auto-assemblages classiques n'étaient pas présents sur les zones de la grille observées.

### 3.3 Autre stratégie de fonctionnalisation : les acides aminés non canoniques

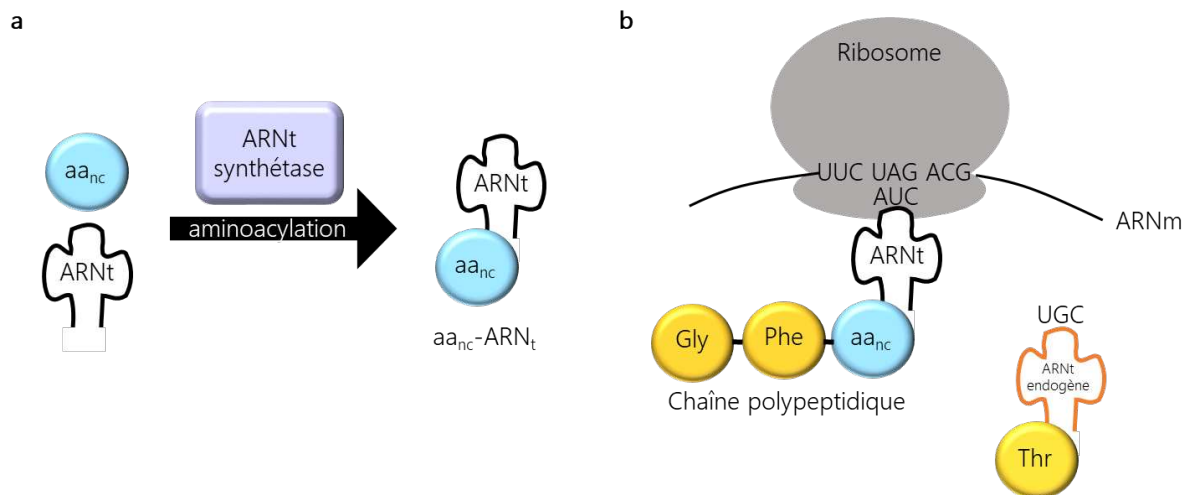
L'introduction d'une cystéine dans la séquence protéique de GbLFY-SAM ne semble pas suffisante pour obtenir un greffage covalent de nanoparticules fonctionnalisées avec un maleimide à l'intérieur des pores des auto-assemblages. De plus, le remplacement de toute la partie C- terminale pour y introduire une ou plusieurs cystéines rend l'obtention des nanostructures en nid d'abeille délicate. Ces mutants de la partie C- terminale oligomérisent fortement et peuvent parfois former des ponts disulfures. Il a donc été décidé de changer le type de chimie utilisée tout en gardant l'optique de ne remplacer qu'un seul acide aminé dans la séquence protéique. Le choix s'est alors porté sur l'incorporation d'un unique acide aminé non canonique dans la séquence protéique de GbLFY-SAM.

#### 3.3.1 Principe des acides aminés non canoniques

Le code génétique permet aux 20 acides aminés naturels d'être codés de la même manière quel que soit l'organisme vivant qui est étudié. Bien qu'un codon corresponde spécifiquement à un acide aminé naturel, il est possible de faire correspondre ce codon à un dérivé d'acide aminé.

C'est Peter Schultz<sup>332-334</sup> qui a développé l'idée d'aller plus loin dans la démarche en reprogrammant le code génétique. Il s'agit d'incorporer des acides aminés dits « non canoniques ». Ils portent ce nom car ils ne peuvent pas être reconnus par les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) endogènes. Ces enzymes catalysent la réaction d'amination sur un ARNt. Cet aminoacyl-ARNt est capable de reconnaître un codon spécifique et pour permettre l'incorporation de l'acide aminé correspondant dans la séquence protéique. Ce système aaRS/ARNt a été détourné pour pouvoir insérer des acides aminés non canoniques (aa<sub>nc</sub>) dans les protéines (Figure 3.13.a). Il faut alors un codon spécifique pour cet aa<sub>nc</sub> ainsi qu'un couple aaRS/ARNt qui permettra la reconnaissance de ce codon et l'incorporation de l'aa<sub>nc</sub> (Figure 3.13.b). Le choix de ce codon spécifique se fait parmi les trois codons STOP, seuls codons ne codant naturellement pour aucun acide aminé. Généralement c'est le codon ambre (UAG) qui est choisi parce que c'est le codon le moins utilisé dans les organismes vivants notamment chez *E. coli*. Par conséquent, la transformation de ce codon STOP en codon codant pour un aa<sub>nc</sub> ne devrait pas perturber significativement le fonctionnement de la bactérie. Pour que le système soit fonctionnel, il faut que le couple aaRS/ARNt permettant l'incorporation de l'acide aminé non canonique soit orthologue. Plus précisément, il faut que les aaRS synthétase endogènes ne puissent pas reconnaître l'ARNt reconnaissant le codon ambre et que la aaRS associée ne sache reconnaître aucun des ARNt endogènes. Potentiellement, ce système permettrait d'incorporer n'importe quel acide aminé modifié dans une protéine.

Le gros avantage de ce système est qu'il est possible d'introduire un unique aa<sub>nc</sub> dans la séquence protéique et ainsi avoir un site spécifique pour, par exemple, fonctionnaliser la protéine *a posteriori*. En revanche, la nécessité d'avoir un couple aaRS/ARNt orthologue implique des phases de sélection et d'évolution dirigée pour aboutir à une très grande spécificité vis-à-vis de l'aa<sub>nc</sub>.



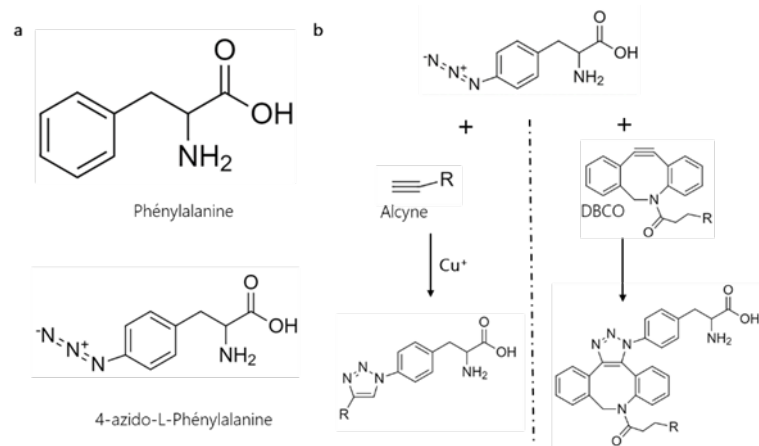
**Figure 3.13 :** Incorporation des  $aa_{nc}$  par la machinerie cellulaire endogène. Le couple aminoacyl-ARNt synthétase/ARNt orthologue permet d'obtenir un  $aa_{nc}$ -ARNt (a) qui va pouvoir reconnaître le codon ambre au ribosome et ainsi ajouté l' $aa_{nc}$  à la chaîne polypeptidique en cours de croissance (b).

### 3.3.2 Choix de l'acide aminé non canonique : la 4-azido-L-phénylalanine

Il y a plus d'une soixante d' $aa_{nc}$  qui ont été incorporés avec succès grâce à des systèmes comme celui décrit en 3.3.<sup>1335</sup>. Dans le cadre de mes travaux de thèse, les critères qui ont guidé le choix de l' $aa_{nc}$  sont :

- La disponibilité immédiate du couple aaRS/ARNt,
- La disponibilité commerciale de l' $aa_{nc}$ ,
- La chimie qu'il est possible de réaliser grâce à cet acide aminé.

Le choix s'est alors porté sur la 4-azido-L-phénylalanine (AzF) qui remplit les critères ci-dessus et dont l'utilisation est bien décrite dans la littérature<sup>336-338</sup>. Cet acide aminé est une phénylalanine sur laquelle a été rajoutée une fonction azoture ( $N_3$ , azide en anglais) en para du cycle aromatique (Figure 3.14.a). L'apport de cette fonction permet une réaction totale et orientée de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par le cuivre. Cette réaction appartient à la famille de la *click-chemistry*. L'azoture réagit avec une fonction alcyne ( $HC\equiv CH$ ) via l'utilisation du catalyseur  $Cu^+$ . Cette cycloaddition alcyne-azoture aboutit à la formation d'un triazole disubstitué (Figure 3.14.b). De plus, elle est rapide, peut se dérouler dans des conditions physiologiques et est chimiosélective ce qui garantit la fonctionnalisation spécifique d'AzF. Il est à noter que cette cycloaddition peut se dérouler sans avoir besoin d'utiliser le  $Cu^+$  comme catalyseur. Des molécules dérivées des cycloalcynes comme le dibenzocyclooctyne (DBCO) sont capables de réagir de manière spontanée et spécifique avec l'azoture. Dans le cas du DBCO, cette spontanéité est possible car le cycle portant l'alcyne est déstabilisé par la présence des benzènes de part et autre du cycle. De ce fait, l'alcyne est très réactif et la réaction ne nécessite pas de  $Cu^+$ .



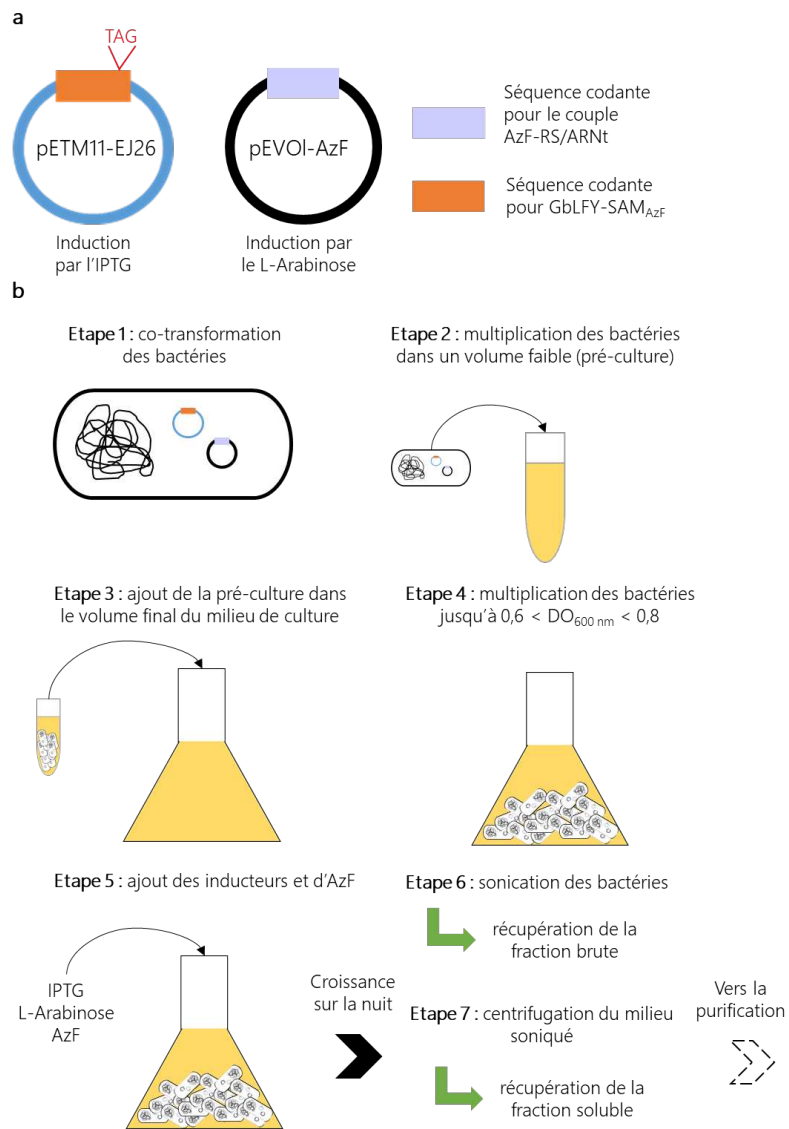
**Figure 3.14 :** La 4-azido-L-Phénylalanine (**a**, en bas) permet l'utilisation de la chimie « click » pour greffer covalentement des molécules sur des protéines soit grâce au Cu<sup>+</sup> (**b**, gauche) qui sert de catalyseur soit sans catalyseur (**b**, droite).

### 3.3.3 Incorporation de AzF dans GbLFY-SAM

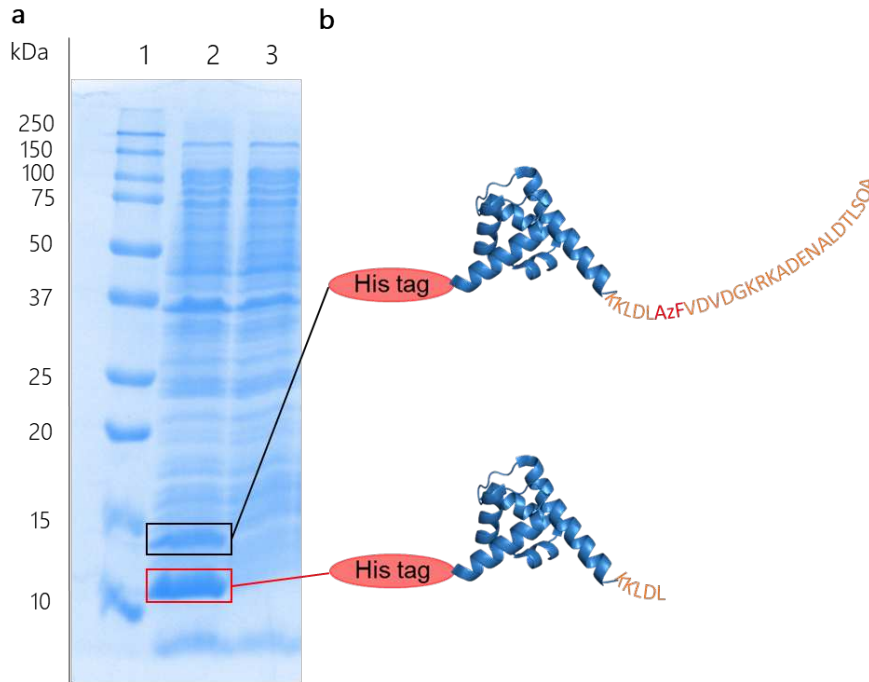
#### 3.3.3.1 Choix des mutations et description de la procédure de production

La stratégie employée pour choisir la position du codant ambre dans la séquence génomique codante pour GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> est basée, elle aussi, sur le principe de perturber le moins possible la structure de la protéine. Ainsi, le codon codant pour la phénylalanine en position 115 a été muté en codant ambre pour incorporer la phénylalanine azoturée (AzF).

La production de ce mutant, GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>, a nécessité une co-transformation des bactéries avec deux plasmides différents (Figure 3.15.a). Le premier est le plasmide pEVOL-AzF codant pour le couple AzF-ARNt synthétase/ARNt spécifique à AzF. Le second est le plasmide, pETM11-EJ26, contenant la séquence codante, avec le codon ambre, pour GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>. La production des protéines codées par les séquences génomiques de ces plasmides est soumise à l'induction de ceux-ci par deux molécules distinctes, le L-Arabinose pour pEVOL-AzF et l'IPTG pour pETM11-EJ26. Lors de la phase exponentielle de croissance des bactéries (0,6 < DO < 0,8), l'AzF (2 mM) ainsi que les deux inducteurs (0,4 mM IPTG / 4 % L-Arabinose) sont rajoutés dans le milieu de culture. La production de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> est laissée sur la nuit (Figure 3.15.b). La production de la protéine a été évaluée en analysant par SDS-PAGE les fractions brutes et les fractions solubles. Le résultat de cette production est présenté dans la Figure 3.16.



**Figure 3.15 :** Schéma du système permettant la production de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>. **a.** Plasmides nécessaires pour la production de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> et du couple AzF-RS/ARNt. **b.** Etapes clés du procédé de production.



**Figure 3.16 :** Analyse par un gel SDS-PAGE des deux fractions brutes et solubles récupérées lors de la purification de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> (a) et représentation schématique des protéines produites (b). Les conditions d'induction sont : 0,4 mM IPTG / 0,4 % L-Arabinose / 2 mM AzF. Puits n°1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits n°2 : Fraction brute. Puits n°3 : Fraction soluble. La coloration au bleu de Coomassie permet de marquer les protéines.

Dans le puits n°2 (fraction brute), il y a deux bandes plus intenses que les autres (bandes encadrées en noir et en rouge). La bande la plus haute, en noir, présente un poids moléculaire qui correspond à celui de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> (MW = 15 854 Da). La bande encadrée en rouge quant à elle à un poids moléculaire d'environ 13 kDa ce qui correspond à une version courte de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> dans laquelle le codon ambre n'a pas pu être reconnu comme un codon codant et donc la production de la protéine s'est arrêtée à ce codon (Figure 3.16.b). Il est aussi à noter que les deux protéines produites ne sont pas solubles dans le tampon classique (puits n°3, fraction soluble) et sembleraient se comporter comme les mutants cystéines pour la purification. Malgré le fait qu'il y ait deux populations de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>, une courte et une complète, le système d'incorporation d'un acide aminé non canonique dans la séquence protéique de GbLFY-SAM est validé. La suite des expériences de cette section a consisté en l'optimisation des conditions de productions.

### 3.3.3.2 Quantité de AzF-RS/ARNt et absorption d'AzF

La production de la protéine dans sa version complète est dépendante de la présence du couple AzF-RS/ARNt codé par le plasmide pEVOL-AzF. Il est nécessaire que ce couple soit présent en quantité suffisante dans la bactérie pour pouvoir bien incorporer l'AzF dans la séquence protéique. L'induction simultanée des plasmides (Figure 3.15.b, étape 5) pourrait ne pas permettre la création d'un stock suffisant d'AzF-RS/ARNt avant que la formation de la chaîne polypeptidique de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> n'arrive au niveau du codon ambre. Les ARNt endogènes reconnaîtraient alors le codon ambre comme un codon STOP ce qui arrêterait la synthèse de la protéine à ce moment-là et aboutirait à la forme courte de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> présentée dans la Figure 3.16.b. Dans cette hypothèse, il apparaît que les paramètres sur lesquels il est possible d'influencer sont :

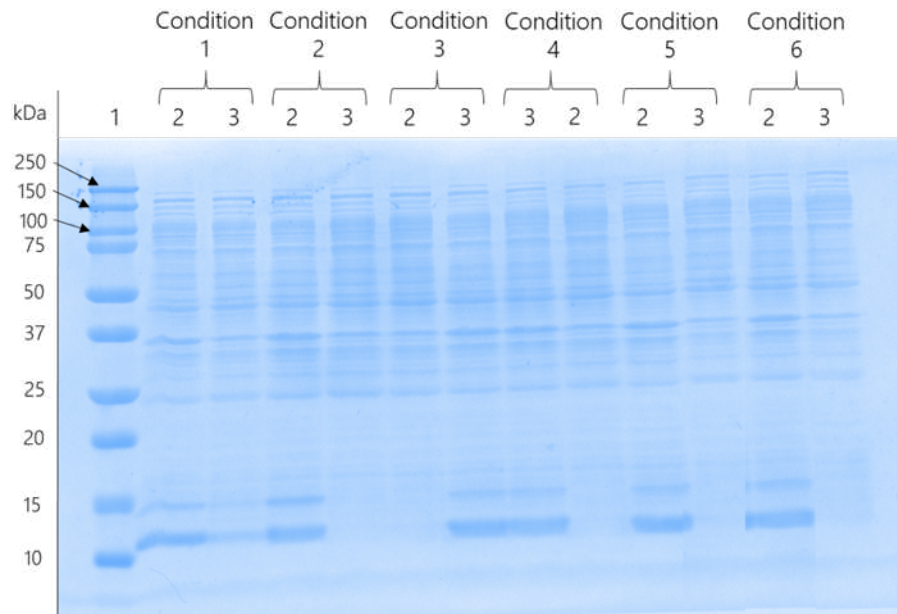
- 1) Les concentrations des deux inducteurs qui peuvent moduler la vitesse d'induction des plasmides,
- 2) L'absorption de l'AzF par la bactérie,
- 3) Le moment d'induction de l'expression des séquences codantes de chaque plasmide.

Par exemple, si la concentration en L-Arabinose est élevée alors le plasmide pEVOL-AzF est induit rapidement et le couple AzF-RS/ARNt produit en conséquence. Par ailleurs, le fait de baisser la concentration d'IPTG permettrait de baisser l'induction du plasmide pETM11-EJ26 empêchant ainsi la production de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> sous forme courte. Enfin, l'AzF n'étant pas un acide aminé naturel, la bactérie peut avoir du mal à le transporter du milieu de culture vers son cytoplasme. Afin de tester ces hypothèses, des tests d'induction ont été mis en place selon les conditions présentées dans le tableau ci-après.

	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4	Condition 5	Condition 6
IPTG [ ] (mM)	0,2	0,04	0,4	0,2	0,2	0,4
Arabinose % (m/v)	0,04	0,04	0,1	0,1	0,1	0,04
[AzF] (mM)	2					
Moment ajout AzF	0,6 < DO <sub>600nm</sub> < 0,8				Au passage à 18°C	
Moment ajout L-Arabinose					0,6 < DO <sub>600nm</sub> < 0,8	
Moment ajout IPTG					0,6 < DO <sub>600nm</sub> < 0,8	

**Tableau 3.3 :** Description des différentes conditions testées pour améliorer la production de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>

Pour toutes les conditions, la production de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> est laissée sur la nuit. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.17.



**Figure 3.17 :** Analyse par un gel SDS-PAGE des fractions butes et solubles des 6 conditions testées pour améliorer la production de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>. Puits n°1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits n°2 : Fraction brute. Puits n°3 : Fraction soluble. La coloration au bleu de Coomassie permet de marquer les protéines.

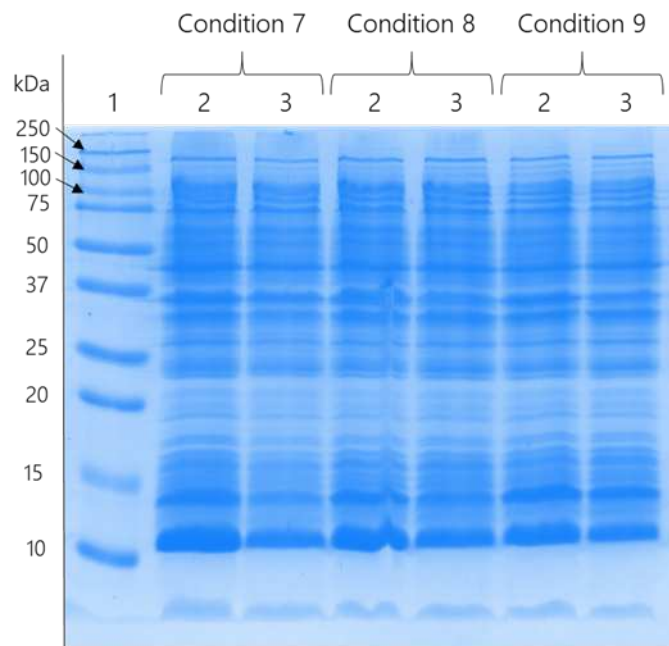
Peu importe la combinaison IPTG/L-Arabinose/AzF testée, le résultat est le même : il y a la présence des deux formes, courte et complète, de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>. Il est cependant intéressant de voir que la condition n°2 donne le même résultat que pour les conditions utilisées lors du premier test de production (condition n°1) et ce, malgré une diminution par 10 de la concentration en IPTG. Il apparaît alors que les concentrations en inducteurs (paramètre 1) ne permettent pas d'expliquer la présence des deux formes du mutant. L'absorption d'AzF par la bactérie (paramètre 2) testée dans les conditions 5 et 6, ne semble pas avoir d'impact sur la production des protéines.

Par la suite, ce sont des combinaisons entre le moment d'induction des plasmides (paramètre 3) et l'absorption d'AzF (paramètre 2) qui ont été testées. L'idée est de différer l'induction des deux plasmides pour laisser le temps à la bactérie de produire, dans un premier temps, le couple AzF-ARNt synthétase/ARNt puis de produire, dans un deuxième temps, GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>. De plus, l'absorption d'AzF sera testée sur un temps plus long que précédemment. Pour ce faire, le L-Arabinose et l'AzF ont été ajoutés à différents moments de la production de la protéine : au moment de l'ajout de la pré-culture bactérienne dans le volume final du milieu de culture (Figure 3.15.b, étape 3) ou lorsque la DO<sub>600 nm</sub> de la culture est entre 0,6 et 0,8 (Figure 3.15.b, étape 4). L'IPTG quant à lui est toujours ajouté 6h après l'ajout du L-Arabinose. 3 combinaisons de conditions ont été testées (Tableau 3.4). Les concentrations en IPTG/L-Arabinose/AzF utilisées sont celles de la condition n°2.

	Condition 7	Condition 8	Condition 9
AzF (2 mM)	Ajout pré-culture	Ajout pré-culture	0,6 < DO <sub>600 nm</sub> < 0,8
L-Arabinose (0,04 %)	Ajout pré-culture	0,6 < DO <sub>600 nm</sub> < 0,8	0,6 < DO <sub>600 nm</sub> < 0,8
IPTG (0,04 mM)	6h après l'induction par le L-Arabinose		

**Tableau 3.4 :** Description des conditions utilisées pour tester le moment d'induction des plasmides.

Le résultat de ces expériences est montré dans la Figure 3.18.



**Figure 3.18 :** Analyse par un gel SDS-PAGE des fractions brutes et solubles des conditions 7, 8 et 9 testées pour améliorer la production de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>. Puits n°1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits n°2 : Fraction brute. Puits n°3 : Fraction soluble. La coloration au bleu de Coomassie permet de marquer les protéines.

Pour chacune des conditions 7, 8 et 9, la production protéique aboutit au mélange entre la version courte et la version complète de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>. Le fait de différer les moments d'induction des plasmides ainsi que les temps plus longs pour l'absorption d'AzF ne permettent pas d'aboutir à la production exclusive de la version complète de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>. Dans ces expériences, il apparaît aussi que les protéines sont solubles (présence des deux bandes dans le puits n°3 pour chaque condition), ce qui reste étonnant car mis à part les moments d'induction différents, rien dans la production n'a été modifié.

### 3.3.3.3 Cinétique de la production

Le seul paramètre resté constant dans toutes les conditions testées et présentées dans la section 3.3.3.2 est la concentration en AzF. Or, si cette concentration est trop faible elle devient immédiatement le facteur limitant de la production de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>. L'hypothèse est que la forme complète de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> est d'abord produite ce qui aboutit à la consommation de la totalité d'AzF. Mais, la production protéique étant laissée sur la nuit, l'induction du plasmide pETM11-EJ26 continue ce qui aboutit à la production de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> dans sa version courte. Différents temps de production ont été réalisés afin de tester cette hypothèse. Les conditions d'induction sont identiques à la condition n°2. Le résultat de la cinétique de production de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> est présenté dans la Figure 3.19.

**Figure 3.19 :** Analyse par un gel SDS-PAGE des fractions brutes et solubles pour différents temps de production de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>. La bande encadrée en rouge pour une production laissée pendant 5h (puits n°2) correspond à la forme courte de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>. Puits n°1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits n°2 :

*Fraction brute. Puits n°3 : Fraction soluble. La coloration au bleu de Coomassie permet de marquer les protéines.*

Pendant les 4 premières heures de production, aucune des formes de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub> n'est produite. A partir de 5h de production, il y a production de la version courte dont la bande correspondante est encadrée en rouge sur la Figure ci-dessus. Il apparaît alors que l'hypothèse proposée juste avant n'est pas valable. Toutes ces expériences mises en perspective montrent qu'il est difficile, dans ce système, d'aboutir à la production uniquement de la version longue de GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>.

### 3.4 Conclusion et perspectives du chapitre

Dans ce chapitre, il a été montré qu'une grande variété de mutants peuvent être conçus rendant la nanostructure en nid d'abeille de GbLFY-SAM très versatile. L'obtention des nids d'abeille n'a pas été aisée et ce malgré l'étude d'une dizaine de tampons d'auto-assemblage. Néanmoins, la diminution de la concentration en CAPS-NaOH et en NaCl présents dans le tampon de purification permet d'améliorer la formation de nid d'abeille. Il reste toujours, lors de l'auto-assemblage, deux populations de structures : des empilées et des planes comme il est habituel de retrouver lors de l'auto-assemblage de GbLFY-SAM (Figure 3.8). Ces deux structures sont présentes quelles que soient les conditions utilisées avec, d'une manière générale, une plus grande proportion (au-delà de 90%) des structures empilées. Une technique qui pourrait permettre de récupérer uniquement les structures planes est le banc de Langmuir. Cette technique a d'abord été utilisée pour créer des couches lipidiques puis elle a été adaptée pour les protéines<sup>339,340</sup>. Elle repose sur l'organisation des molécules d'intérêt à l'interface liquide-air et, par compression contrôlée, ces molécules se retrouvent compactées en monocouche dense. Un système de bras mécanique permet de récupérer cette monocouche sur un substrat qui est accroché au bras. Il peut alors être imaginé que les auto-assemblages plans se forment proche de la surface et par compression il serait possible de créer un grand film à l'interface liquide-air. Les grosses structures empilées, par effet de sédimentation, tomberaient au fond du liquide.

L'objectif sous-jacent à la création de ces mutants était de pouvoir ajouter des cystéines dans le nid d'abeille pour pouvoir chélater, entre autres, les ions Au<sup>3+</sup> à l'intérieur des pores pour obtenir des nanostructures métalliques pour des applications en biocapteurs. L'insertion d'une unique cystéine (GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> et GbLFY-SAM<sub>(GGS)<sub>2</sub>C</sub>) dans la partie C- terminale ne permet pas de diriger cette chélation à l'intérieur des pores. L'utilisation de plusieurs cystéines (GbLFY-SAM<sub>(GGS)<sub>2</sub>(CH)<sub>3</sub>C</sub>) reste quant à elle sans réponse. La deuxième stratégie employée ici a été l'utilisation de la réaction spécifique entre une fonction maléimide et la fonction thiol des cystéines pour greffer des nanoparticules d'or. Bien que les nanoparticules arrivent à se positionner spécifiquement à l'intérieur des pores de l'auto-assemblage, elles ne sont pas greffées de manière covalente dans ceux-ci. Nous pourrions utiliser ces nanoparticules comme points d'ancrage même si elles ne sont pas greffées covalamment dans les auto-assemblages. Cependant, comme elles se désorbent de ceux-ci lorsque la grille est lavée, il doit être envisagé une étape de réticulation par exemple avec du glutaraldéhyde avant d'envisager un ajout d'ions Au<sup>3+</sup> puis une réduction de ceux-ci pour réunir les nanoparticules et ainsi aboutir à la formation de nanopiliers. Dans la partie 3.2, il a été évoqué que le greffage soit inefficace à cause d'un problème d'accessibilité de la cystéine. Au-delà des mutants GbLFY-SAM<sub>(GGS)<sub>2</sub>C</sub> et GbLFY-SAM<sub>(GGS)<sub>2</sub>(CH)<sub>3</sub>C</sub> qui devraient répondre à cette interrogation, il peut être envisagé d'aller plus loin dans l'idée de vider les pores pour améliorer l'accessibilité. Comme il a été montré dans le Chapitre 2, la partie N-terminale est elle aussi à l'intérieur des pores et son raccourcissement est possible sans modifier

la capacité d'auto-assemblage des protéines. De nouveaux mutants pourraient alors être créés en combinant une partie N- terminale courte et une partie C- terminale modifiée contenant la ou les cystéines. Concernant la chimie utilisée dans ces expériences, seule la réaction entre le maléimide et le thiol a été étudiée. Dans des travaux précédents sur des cristaux en solution de GbLFY-SAM<sub>K110C</sub>, il a été montré qu'il est possible de greffer spécifiquement la cystéine avec un complexe de ruthénium fonctionnalisé avec un iodoacétamide<sup>315</sup>. L'utilisation de nanoparticules d'or fonctionnalisées cette fois avec un iodoacétamide apparaît alors comme une voie prometteuse bien qu'elle implique soit une synthèse personnalisée des nanoparticules soit une fonctionnalisation de nanoparticules commerciales avec une fonction iodoacétamide.

Pour que la chimie sur les fonctions thiol soit spécifique, le pH doit être finement contrôlé pour éviter des réactions indésirables sur les amines des arginines et des lysines. De plus, changer complètement la partie C- terminale de la protéine rend extrêmement fragile l'obtention de la structure en nid d'abeille contrairement à la mutation d'un seul acide aminé. Le choix s'est alors porté sur l'introduction d'un acide aminé non canonique dans la séquence protéique. L'utilisation d'un tel système permet d'avoir une unique mutation (comme pour le mutant GbLFY-SAM<sub>K110C</sub>) tout en introduisant une chimie différente de la chimie thiol : la chimie click par l'insertion d'une phénylalanine azoturée. La production d'une telle protéine a été validée. Malgré les différentes optimisations effectuées, cette production aboutit toujours à l'obtention de deux populations de protéines qui ne peuvent pas être séparées l'une de l'autre car elles ont un poids moléculaire trop proche avec une différence de seulement 2 kDa. Pour la suite, il est envisagé de déplacer la mutation pour l'incorporation d'AzF et de la placer dans la partie N- terminale à la position 23 dans la séquence en acide aminé. Malgré cet emplacement de mutation, il y aurait certainement deux populations de protéine mais cette fois distinctes de 13 kDa ce qui est facilement séparable par SEC.

## Chapitre 4 : Utilisation des nids d'abeille GbLFY-SAM pour des applications en biocapteurs

Le troisième axe de recherche de ma thèse a consisté à évaluer l'utilisation des auto-assemblages GbLFY-SAM pour des applications en biocapteurs. L'idée est d'utiliser ces auto-assemblages pour augmenter la surface spécifique dans le but d'accroître la sensibilité de deux types de biocapteurs.

Le premier type de biocapteur étudié est un biocapteur colorimétrique pour détecter le glucose. C'est la capacité de chélation des ions  $\text{Cu}^{2+}$  à l'intérieur des pores des auto-assemblages de GbLFY-SAM pour former des nanoparticules qui est exploitée. Les nanoparticules de cuivre sont décrites dans la littérature comme présentant des propriétés catalytiques de type peroxydase. Le but de ces travaux a été d'évaluer les propriétés catalytiques des nanoparticules de cuivre piégées dans les auto-assemblages GbLFY-SAM qui ont été décrites dans le Chapitre 2.

Le second type de biocapteur étudié est basé sur des signaux de type résonance des plasmons de surface afin de détecter des composés organiques volatiles en prenant comme exemple le phénol. La première intention dans l'exploitation des auto-assemblages GbLFY-SAM dans ce type de biocapteur a été d'utiliser les mutants décrits dans le chapitre précédent pour créer des nanostructures en or. Mais, au vu de la difficulté d'obtenir des auto-assemblages mutants, nous avons préféré évaluer les propriétés de détection du phénol de GbLFY-SAM en nous appuyant sur le film protéique organisé décrit dans le Chapitre 2.

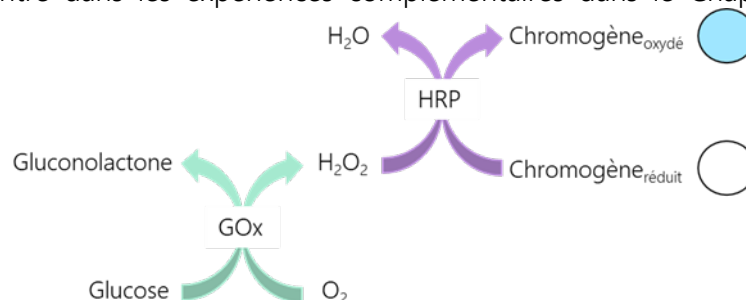
## 4.1 Activité de type peroxydase des nanoparticules : biocapteurs pour la détection de glucose

### 4.1.1 Intérêt des nanoparticules métalliques dans les biocapteurs à glucose

Détecter le glucose dans le sang ou le sérum d'un patient est une préoccupation des chercheurs depuis les années 60<sup>341</sup>. Cette molécule est le principal élément fournissant de l'énergie dans le corps humain. Si sa concentration vient à être déséquilibrée, cela aboutit à la formation du diabète, une maladie chronique dont l'évolution doit être constamment monitorée. Le développement de biocapteurs à glucose s'est rapidement mis en place aboutissant à des dispositifs commerciaux permettant de suivre la glycémie des patients. Ces biocapteurs impliquent une enzyme, la glucose oxydase (GOx), capable d'oxyder le glucose en gluconolactone et produisant du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) dont la formation peut être suivie grâce à des dispositifs électrochimique<sup>342</sup>. Le fait que le diabète ne puisse être guéri rend nécessaire l'analyse régulière du glucose dans le sang. Grâce à leur simplicité, leur faible coût et leur praticité, les dispositifs de type colorimétriques trouvent leur place dans ce contexte. Ils permettent l'interprétation du résultat par tous à l'aide de l'œil nu et ne nécessitent aucun équipement onéreux. La plupart du temps, ces dispositifs colorimétriques reposent sur des substrats dont l'oxydation, en présence d' $H_2O_2$  produit par la GOx, entraîne un changement de couleur (Figure 4.1). La mesure de l'absorbance de ce chromogène permet alors de déterminer la concentration de glucose dans le sérum ou le plasma des patients. Cependant, cette réaction nécessite un catalyseur. La peroxydase du raifort (*horseradish peroxidase*, HRP) est largement utilisée en tant que catalyseur. Elle présente néanmoins quelques désavantages comme la nécessité d'avoir un environnement réactionnel parfaitement contrôlé (pH, température...) ou encore sa production/purification ainsi que sa conservation. En effet, en fonction des lots de production, l'activité catalytique de l'enzyme peut varier tout comme elle peut se dégrader au fil du temps.

Depuis quelques années, des nanomatériaux ont été développés dans le but de remplacer la HRP<sup>343</sup>. Parmi ces nanomatériaux, nous retrouvons les nanoparticules métalliques qui ont montré des propriétés intrinsèques d'activité catalytique de type peroxydase. Nous pouvons par exemple citer les nanoparticules de platine, de cuivre, d'or ou de nickel. Par ailleurs, ces nanoparticules peuvent être supportées par des biomatériaux comme le chitosan<sup>344,345</sup>, des peptides<sup>346</sup> ou encore des protéines<sup>347,348</sup>.

Nous avons montré dans les expériences complémentaires dans le Chapitre 2 qu'il était

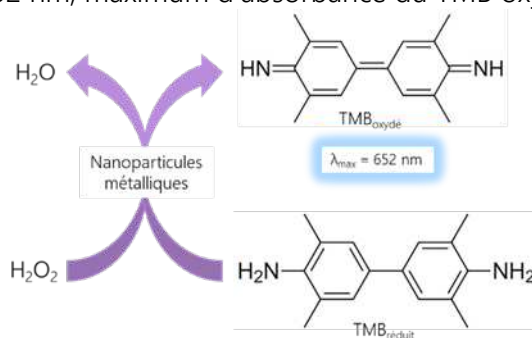


**Figure 4.1 :** Réactions mises en œuvre dans le cadre d'une détection colorimétrique du glucose. GOx : glucose oxydase. HRP : peroxydase du raifort.

possible de chélater des ions  $Cu^{2+}$  et de les réduire *in situ* dans les pores de l'auto-assemblage de GbLFY-SAM. La question de l'activité peroxydase de ces nanoparticules de cuivre (CuNp) s'est alors posée. L'idée est d'évaluer leur activité catalytique pour, si c'est pertinent, pouvoir les intégrer dans un dispositif biocapteur à glucose colorimétrique.

### 4.1.2 Réaction TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalysée par des nanoparticules métalliques

La réaction proposée ici a pour but de mesurer par colorimétrie une concentration donnée en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le chromophore utilisé dans ces expériences est le 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (TMB). Ce substrat est largement utilisé dans des expériences de type ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Lorsqu'il est sous sa forme réduite, il est incolore. Lorsqu'il est oxydé, il produit une couleur bleue. La formation de cette couleur est alors directement proportionnelle à la quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit dans le milieu. Ce changement de couleur peut être monitoré par la mesure de l'absorbance à 652 nm, maximum d'absorbance du TMB oxydé (Figure 4.2).



**Figure 4.2 :** La réaction entre le TMB et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalysée par des nanoparticules métalliques permet d'obtenir une teinte bleue dont le maximum d'absorbance se situe à 652 nm.

L'utilisation de ce système pour évaluer l'activité peroxydase des nanoparticules est décrite dans la littérature. Afin de réaliser les expériences de test d'activité de type peroxydase, nous nous sommes appuyés sur plusieurs articles de la littérature qui décrivent cette réaction. Les principales caractéristiques de la mise en place de ces expériences sont résumées dans le tableau 4.1

Nature/quantité des nanoparticules	[TMB] (mM)	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (mM)	Tampon et pH	Temps de réaction (min)	Température (°C)	Référence
Or/Non indiqué	3,4	112	Acétate 4,2	10	50	344
Platine/900 nM	0,125	125	PBS 4,0	20	25	347
Platine/Non indiqué	0,5	1,25	PBS 4,5	10 à 30	45	348
Cuivre/20 µg	1	100	Acétate 4,0	10	Ambiante	349
Cuivre/ « Given concentration »	0,5	750	MES 5,0	5	Non précisée	346
Or/60 ng	0,3	300	Acétate 4,0	20	25	345

**Tableau 4.1 :** Caractéristiques principales des expériences de catalyse de la réaction TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tirées de la littérature. PBS : tampon phosphate salin. MES : 2-(N-morpholino)éthanosulfonique.

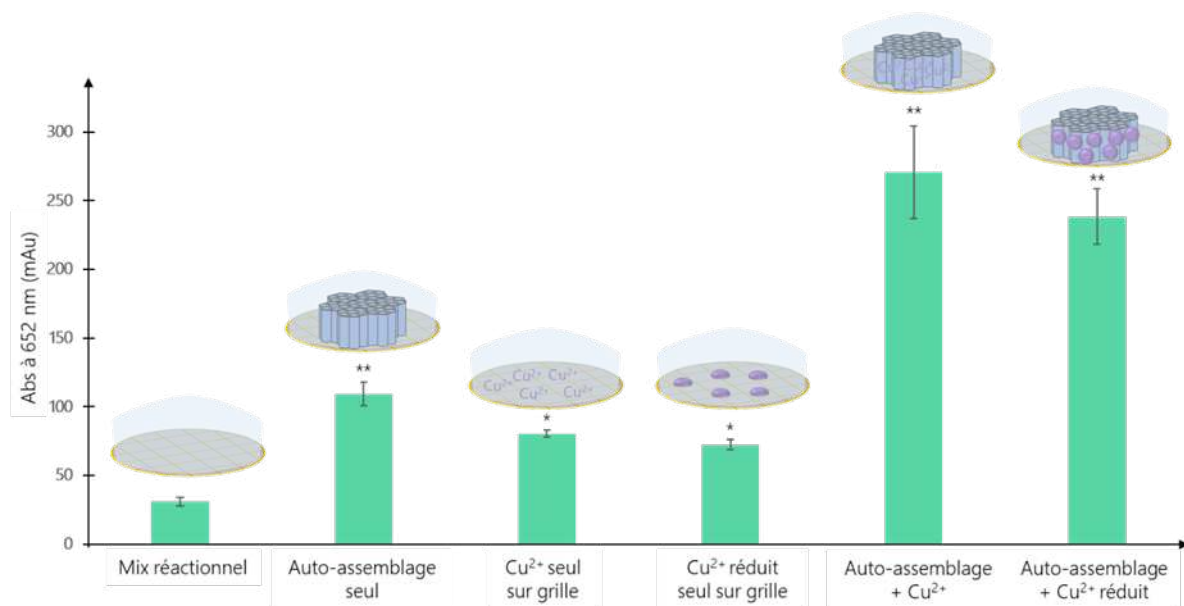
La principale différence entre les expériences extraites de la littérature et celles mises en place dans ma thèse est la surface sur laquelle repose les auto-assemblages GbLFY-SAM fonctionnalisés avec les CuNp. Cette spécificité peut induire plusieurs verrous. Tout d'abord, la quantité exacte de nanoparticules n'est pas connue. De plus, du fait de la présence de la surface, la catalyse de la réaction sera en partie dépendante de la diffusion des substrats vers les nanoparticules.

Il y a deux principaux intérêts dans l'utilisation de l'auto-assemblage GbLFY-SAM fonctionnalisé avec les CuNp. D'une part la superposition des CuNp à l'intérieur de chaque pore peut aboutir à une meilleure sensibilité. D'autre part, le fait qu'elles soient imbriquées dans l'auto-assemblage et que le tout soit déposé sur une surface pourrait permettre une réutilisation de ces CuNp pour des analyses successives.

### 4.1.3 Evaluation de l'activité peroxydase de l'auto-assemblage GbLFY-SAM fonctionnalisé avec des CuNp

#### 4.1.3.1 Intérêt de la nanostructuration de surface par l'auto-assemblage

La première étape dans l'évaluation de l'activité peroxydase de la structure en nid d'abeille est de montrer si la nanostructuration de surface par l'auto-assemblage permet une augmentation du signal d'absorbance par rapport à une surface dépourvue d'auto-assemblage. Les premiers tests ont consisté à reprendre les mêmes conditions de fonctionnalisation décrites dans le Chapitre 2 (30 équivalents en  $\text{Cu}^{2+}$ , 5 min de réduction par le  $\text{NaBH}_4$ ) sur les grilles de microscopie présentant un film carbone amorphe sur une grille en or. En parallèle, des expériences témoins sans les auto-assemblages ou sans les ions  $\text{Cu}^{2+}$  ont été réalisées. Dans un premier temps, les conditions de réactions choisies sont  $[\text{TMB}] = [\text{H}_2\text{O}_2] = 20 \text{ mM}$ , 50 mM tampon acétate à pH 4,2 pendant 20 min à température ambiante en se basant sur les informations extraites de la littérature (Tableau 4.1). Nous avons choisi une concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  plus faible par rapport à la littérature parce qu'une quantité trop importante pourrait aboutir à la destruction des auto-assemblages. La concentration en TMB est par ailleurs plus élevée pour que le système ne soit pas limité à cause du phénomène de diffusion du substrat. Les résultats de ces catalyses sont présentés dans la Figure 4.3.



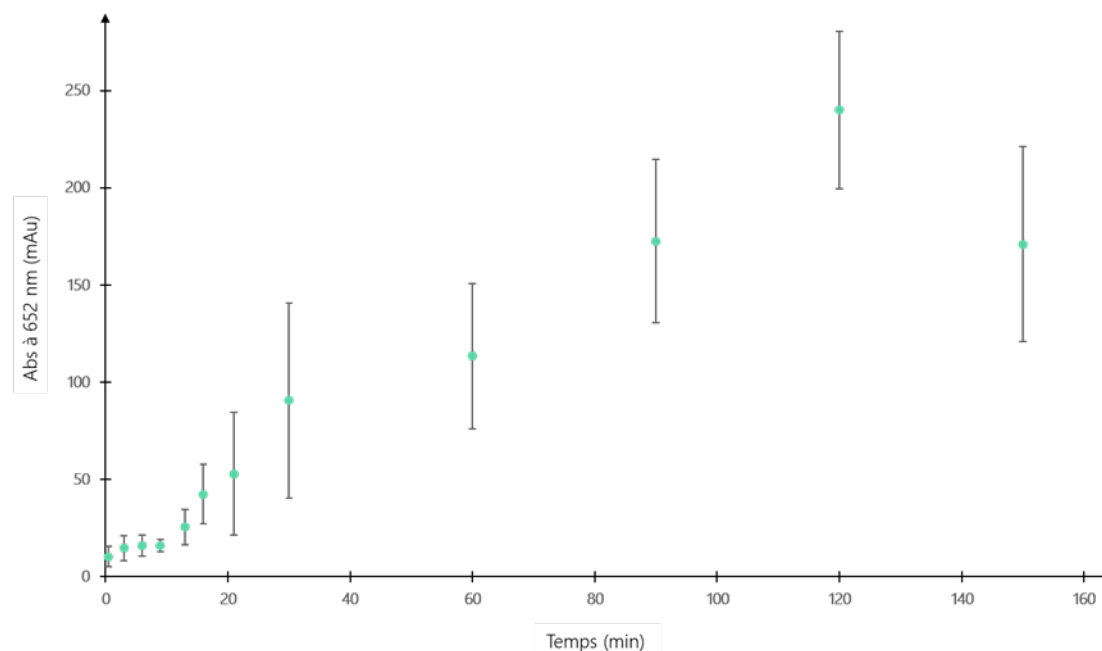
**Figure 4.3 :** Mesures d'absorbance représentant la catalyse de la réaction TMB/ $\text{H}_2\text{O}_2$  selon différentes conditions indiquées sous chaque histogramme. La composition de chaque réaction est illustrée en haut de

chaque histogramme Les mesures ont été réalisées après 20 min de réaction. La composition du mix réactionnel est  $[TMB] = [H_2O_2] = 20 \text{ mM}$ , 50 mM tampon acétate à pH 4,2. La barre d'erreur représente l'écart-type de la moyenne mesurée sur deux grilles indépendantes. \* significatif, 2 fois le signal du mix réactionnel. \*\* très significatif, 3 fois le signal du mix réactionnel.

Dans le cadre de cette expérience, nous avons choisi de baser la significativité d'une réaction sur la valeur d'absorbance du mix réactionnel ( $[TMB] = [H_2O_2] = 20 \text{ mM}$ , 50 mM tampon acétate à pH 4,2). Nous considérons alors qu'à partir de 2 fois l'absorbance du mix réactionnel, l'absorbance mesurée est significative. Les auto-assemblages seuls semblent présenter une activité catalytique de même niveau que les ions  $Cu^{2+}$  réduits ou non. Cela peut être dû à une contamination par les ions  $Cu^{2+}$  des grilles témoins lors de leur manipulation. Il pourrait aussi s'agir de la réaction entre la grille en or et le mix réactionnel si, par exemple, le film carbone a été déchiré laissant ainsi l'or être en contact avec le mix réactionnel. L'absorbance mesurée dans le cadre de l'auto-assemblage fonctionnalisé avec les ions  $Cu^{2+}$  réduits ou non présente une augmentation significative par rapport aux contrôles sans auto-assemblage ou sans  $Cu^{2+}$ . Ces expériences montrent que la nanostructuration de surface par l'auto-assemblage présente un intérêt. Il peut être supposé que l'utilisation des auto-assemblages GbLFY-SAM permet de chélater plus d'ions  $Cu^{2+}$  que la grille nue et de ce fait, augmente l'activité catalytique du système. Il est aussi à noter que la réduction des ions  $Cu^{2+}$  semble diminuer légèrement le signal d'absorbance. Ceci peut être dû à la dégradation de certains auto-assemblages lorsqu'ils sont mis en contact avec le  $NaBH_4$ , aboutissant à leur décrochage de la grille.

#### 4.1.3.2 Cinétique de la réaction

De la même manière qu'une réaction médiée par une enzyme naturelle, l'activité peroxydase des CuNp dépend de plusieurs paramètres dont le temps. Afin de tester ce paramètre, 12 réactions (en tripliquat) allant de  $t=0$  à  $t=150 \text{ min}$  ont été réalisées. La multiplication des réactions s'explique car les auto-assemblages disposés sur des grilles de microscopie ne permettent pas une mesure en continu de l'absorbance comme il peut être réalisé classiquement dans une cuve de spectrophotométrie. En effet, seulement 4  $\mu\text{L}$  de mix réactionnel peuvent être disposés en même temps sur une grille. La cinétique de la réaction entre le TMB et l' $H_2O_2$  médiée par les CuNp dans les auto-assemblages GbLFY-SAM est donc réalisée sur plusieurs grilles différentes à des temps donnés. L'expérience a été répétée 3 fois. La compilation de ces expériences est présentée dans la Figure 4.4.



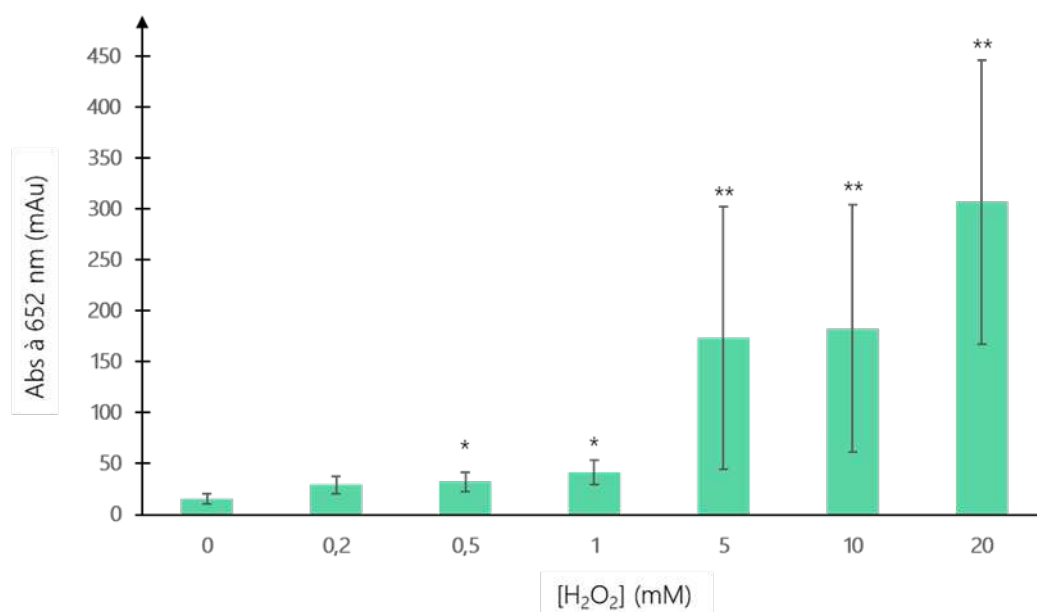
**Figure 4.4 :** Cinétique moyenne de la réaction d'oxydation du TMB par le  $H_2O_2$  médiée par les CuNp contenues dans les pores de l'auto-assemblage de GbLFY-SAM. Les conditions de réaction sont  $[TMB] = [H_2O_2] = 20$  mM, 50 mM tampon acétate à pH 4,2. La barre d'erreur représente l'écart-type de la moyenne mesurée sur trois grilles indépendantes.

La variation des mesures entre les trois expériences est très importante et laisser la réaction se dérouler au-delà de 120 min aboutit à une diminution de l'absorbance mesurée probablement à cause de l'instabilité du TMB oxydé. Cependant, du fait de la forte variabilité entre les expériences réalisées, il est aussi possible qu'à partir de 90 min il y ait l'apparition d'un plateau cinétique. L'absorbance augmentant continuellement jusqu'à 120 min, c'est ce temps-là qui a été choisi pour la suite des expériences. Il est aussi à noter que comparé aux expériences précédentes, l'absorbance à 20 min est deux fois moins importante dans la cinétique. Ceci pose la question de la répétabilité de la fonctionnalisation des CuNp dans les auto-assemblages GbLFY-SAM.

#### 4.1.3.3 Sensibilité du système

Le but de l'utilisation des auto-assemblages de GbLFY-SAM fonctionnalisés avec des CuNp est de tirer avantage de la nanostructuration de surface pour diminuer la limite de détection du  $H_2O_2$  dans un système de biocapteur à glucose. Ainsi, des concentrations en  $H_2O_2$  de 0 à 20 mM ont été testées. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.5.

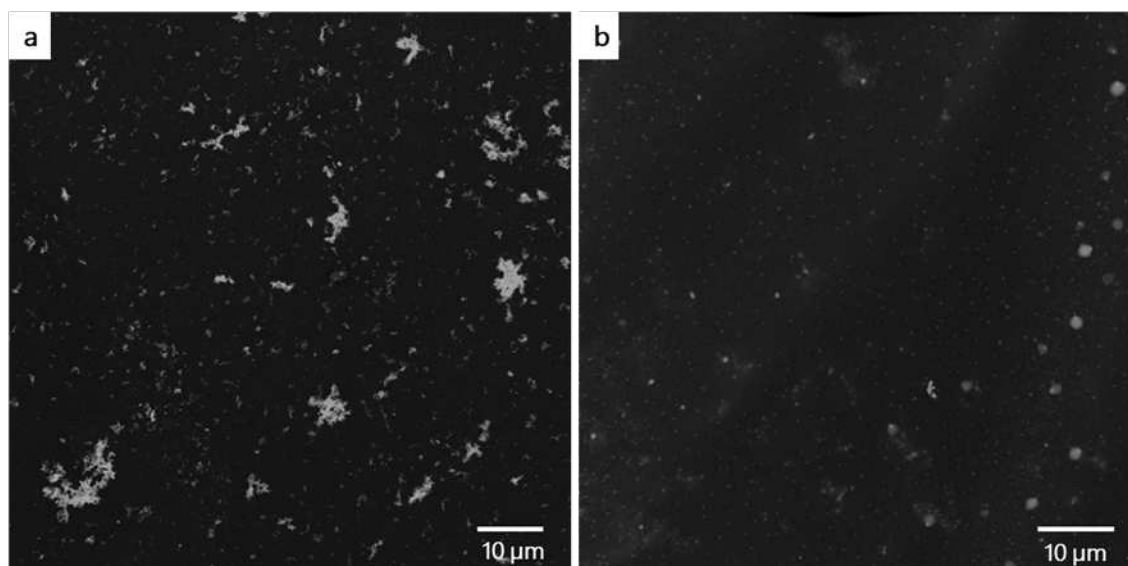
Dans la gamme de concentration de 0 à 20 mM de  $H_2O_2$ , il n'y a pas de relation linéaire entre l'absorbance mesurée et la concentration du  $H_2O_2$ . La variabilité pour les concentrations 5, 10 et 20 mM est grande. Ce qui pose à nouveau la question de la répétabilité des expériences.



**Figure 4.5 :** Variation de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour évaluer la sensibilité des CuNp contenues dans les pores de l'auto-assemblage de GbLFY-SAM. Les conditions de réaction sont [TMB] = 20 mM, 50 mM tampon acétate à pH 4,2, temps de réaction = 2h. La barre d'erreur représente l'écart-type de la moyenne mesurée sur quatre grilles indépendantes. \* significatif, 2 fois le signal pour [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0 mM. \*\* très significatif, 3 fois le signal pour [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0 mM.

#### 4.1.3.4 Répétabilité : caractérisation des auto-assemblages

La répétabilité des expériences de la catalyse TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est dépendante de la formation des auto-assemblages de GbLFY-SAM sur les grilles mais aussi de la robustesse de la fonctionnalisation des auto-assemblages par les ions Cu<sup>2+</sup> ainsi que de leur réduction. En parallèle de ces expériences de catalyse, des grilles ont été préparées en même temps en utilisant les mêmes conditions pour s'assurer de la bonne formation des auto-assemblages ainsi que leur fonctionnalisation. Puis ces grilles ont été caractérisées en STEM. La Figure 4.6 montre le résultat de ces expériences.



**Figure 4.6 :** Image STEM des auto-assemblages de GbLFY-SAM après fonctionnalisation par les ions  $\text{Cu}^{2+}$  (30 équivalents) (a) puis après réduction de ces ions (5 min,  $\text{NaBH}_4$ ) (b). Seuls les ions  $\text{Cu}^{2+}$  sont responsables du contraste de ces images. Le marquage apparaît blanc au lieu de noir car le détecteur STEM utilisé ici est le détecteur dark field.

La Figure 4.6.a montre une vue en champ large des auto-assemblages GbLFY-SAM fonctionnalisés uniquement avec les ions  $\text{Cu}^{2+}$  (30 équivalents). Tout ce qui apparaît en gris est des auto-assemblages bien formés, parfois empilés. La Figure 4.6.b. montre une vue similaire mais après la réduction par le  $\text{NaBH}_4$  pendant 5 min. Les auto-assemblages se sont désorbés de la surface et il reste uniquement des petits cristaux de sels. Il est probable que les auto-assemblages désorbés se retrouvent dans la solution de  $\text{NaBH}_4$ . Il apparaît alors que les mesures d'absorbance précédentes pourraient ne pas être dues aux CuNp contenues à l'intérieur des pores des auto-assemblages.

#### 4.1.4 Conclusion

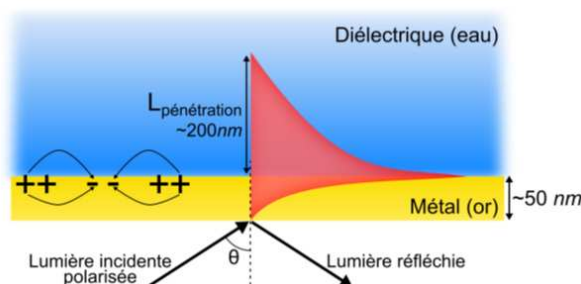
La nanostructuration de la surface par les auto-assemblages de GbLFY-SAM permet de chélater plus d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  que la grille nue ce qui augmente l'activité peroxydase du système d'un facteur 2 (Figure 4.3). Les CuNp créées *in situ* dans l'auto-assemblage GbLFY-SAM présentent elles aussi une activité de type peroxydase. Cependant, le manque de reproductibilité de la fonctionnalisation des auto-assemblages par les ions  $\text{Cu}^{2+}$  lors de leur réduction, empêche d'aller plus loin dans les conclusions de ces expériences. Il apparaît alors que l'auto-assemblage GbLFY-SAM fonctionnalisé uniquement avec les ions  $\text{Cu}^{2+}$  pourrait être utilisé dans des applications de biocapteurs à glucose. Néanmoins, nous perdrons le côté réutilisable de l'ensemble car les ions  $\text{Cu}^{2+}$  finiront par se désorber du système afin de catalyser la réaction entre le TMB et l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Dans la section 4.1.3.1., il a été évoqué le fait que l'absorbance mesurée sur la grille contrôle contenant uniquement les auto-assemblages pouvait être due à la réaction entre le mix réactionnel et la grille métallique en or lorsque le film carbone est cassé. Pour s'affranchir de cette possibilité, il doit être envisagé de changer de surface en utilisant par exemple des wafers de silicium, surface dont nous avons déjà montré qu'elle permettait d'obtenir des auto-assemblages de GbLFY-SAM. Par ailleurs, il pourrait être intéressant par la suite d'utiliser de la chimie de surface afin de coupler de manière covalente les auto-assemblages à la surface. De cette manière, ils ne seraient plus désorbés de celle-ci lors de la réduction des ions  $\text{Cu}^{2+}$ .

## 4.2 Détection de composés organiques volatiles par résonance des plasmons de surface

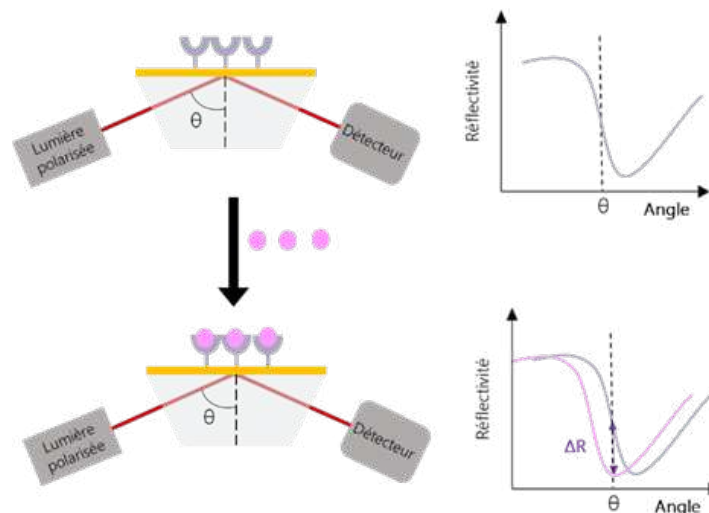
### 4.2.1 Principe de la résonance des plasmons de surface

La résonance des plasmons de surface (*Surface Resonance Plasmon, SPR*) est un phénomène physique qui se produit à l'interface entre un métal, généralement de l'or, et un milieu diélectrique tel que l'air ou l'eau. Une lumière incidente et polarisée va venir exciter les électrons du métal tout en étant réfléchi de manière totale. L'interaction entre les photons de la lumière incidente et les électrons du métal va entraîner la formation d'une onde plasmonique dans la couche métallique. Cette onde se propage ensuite dans le milieu diélectrique sous forme d'onde évanescente sur une épaisseur allant jusqu'à 200 nm (Figure 4.7).



**Figure 4.7 :** Principe de la résonance des plasmons de surface. La lumière incidente excite les électrons du métal qui créent une onde plasmonique dans la couche métallique. Cette onde se propage sous forme d'onde évanescente (en rouge) dans le milieu diélectrique. Dans cette zone, les événements d'interaction vont produire un changement d'indice optique ce qui modifiera la lumière réfléchi. Schéma tiré de la référence<sup>350</sup>.

Dans un dispositif classique, des récepteurs vont être fonctionnalisés sur la surface métallique. L'interaction entre un analyte et son récepteur va alors changer localement l'indice optique à la surface du métal. Ainsi, la quantité de lumière réfléchi va être modulée. Ce sont ces variations de réflectivité qui sont suivies dans les biocapteurs SPR. (Figure 4.8). Ainsi, en se plaçant à un angle fixe  $\theta$ , appelé angle de travail, les événements d'interaction/désorption au niveau de la surface vont pouvoir être suivis en observant une différence de réflectivité ( $\Delta R$ ). Cet angle est généralement choisi là où la pente de la courbe plasmon est la plus importante afin de mieux apprécier la différence de réflectivité induite par les interactions.

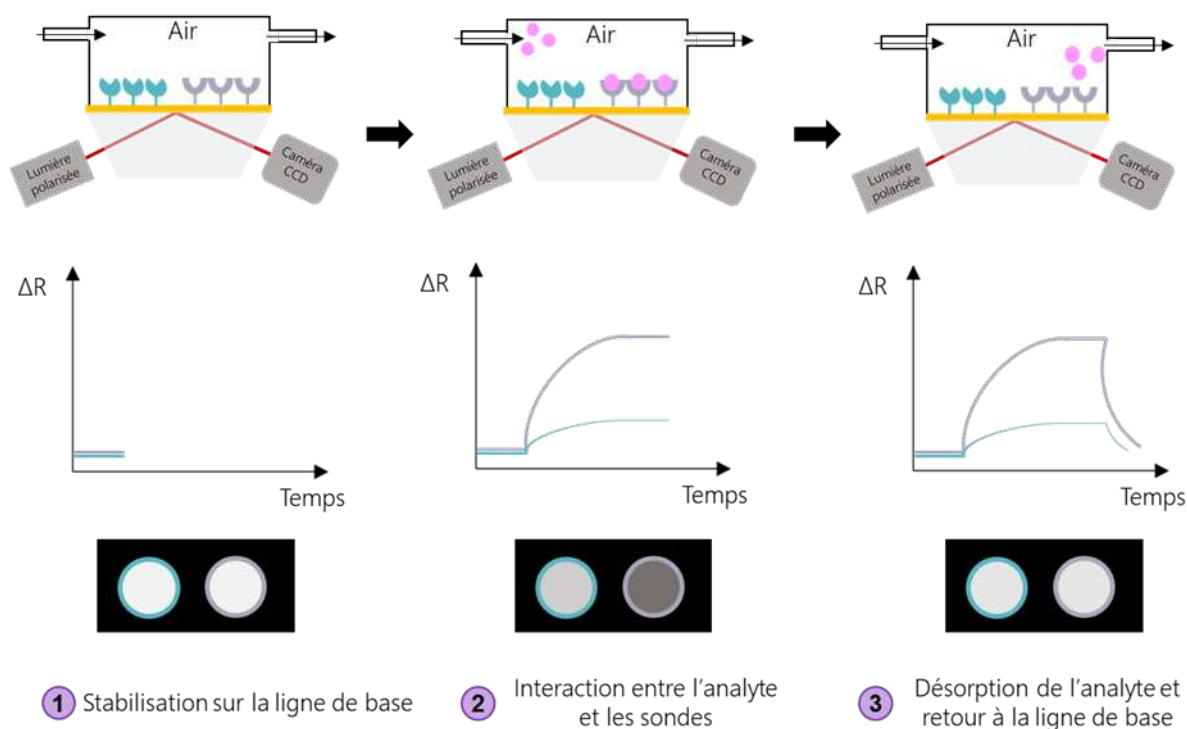


**Figure 4.8 :** La fixation d'un angle de travail  $\theta$  au maximum de la pente de la courbe plasmon permet d'observer le changement local d'indice optique créé lors de l'interaction entre l'analyte (en rose) et la sonde fonctionnalisée à la surface (en gris) par le biais de la mesure d'une différence de réflectivité ( $\Delta R$ ).

#### 4.2.2 Détection de composés organiques volatiles

La détection de composés organiques volatiles (COV) est cruciale dans des domaines aussi divers que la qualité de l'air, le diagnostic médical ou encore l'agroalimentaire<sup>351</sup>. Les COV sont des petites molécules carbonées dont le poids moléculaire est inférieur à 300 Da. Ils ont des propriétés odorantes et sont aussi considérés comme des messagers chimiques. Actuellement, les outils les plus développés pour leur détection sont soit les nez humains ou canins soit des dispositifs de type chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse.

Depuis les années 90, les nez électroniques (eNose) s'appuyant sur le principe de l'olfaction des mammifères se sont développés notamment pour répondre aux besoins de détection des COV<sup>352</sup>. Ces dispositifs sont des biocapteurs biomimétiques qui sont capables de reconnaître des odeurs. Ils utilisent le même système discriminatif que le nez humain : un récepteur olfactif peut reconnaître plusieurs molécules volatiles et la combinaison de plusieurs récepteurs permet de remonter à une association particulière caractéristique de l'odeur. Ce système de multiplexage nécessite de modifier le capteur présenté dans la Figure 4.8 en utilisant, par exemple, la SPR en mode imagerie (SPRi). La différence entre SPRi et SPR consiste en la présence d'une caméra CCD (*charge couple device*) comme détecteur. Ceci permet de suivre simultanément plusieurs régions d'intérêt sur l'image. Ainsi, nous pouvons délimiter une zone qui correspond à chaque type de récepteur. Au sein de l'équipe CREAB du laboratoire SyMMES, la SPRi est une des thématiques centrales<sup>353-355</sup>. En se basant sur ce principe combinatoire de récepteurs et la SPRi, nous utilisons des sondes spécifiques comme les peptides ou les protéines afin de créer des dispositifs biomimétiques permettant de détecter des COV en très faible quantité. Le dispositif utilisé ici est un dispositif dit « gaz » c'est-à-dire que la détection des COV intervient en milieu aérien et non liquide. Il est à noter que le modèle « liquide » est le plus courant et compose la majorité des dispositifs SPR commerciaux. Dans le système « gaz » développé au CREAB, des plots composés de différents types de sondes sont fonctionnalisés à la surface d'un prisme d'or (Figure 4.9). En fixant l'angle de travail, les événements d'interaction et de désorption entre les sondes et les COV vont pouvoir être étudiés en fonction du temps. Nous pourrions ainsi discriminer les sondes les plus spécifiques pour un COV donné.



**Figure 4.9 :** Déroulement simplifié d'un suivi SPRi gaz. Des plots distincts de deux sondes différentes (en gris et en bleu) sont créés sur la surface du prisme. La mise en contact de l'analyte (en rose) avec les sondes va modifier la réflectivité au niveau des plots. Le changement de luminosité des plots plus spécifiques sera plus intense. Au niveau des courbes plasmons, cela se traduit par un saut de réflectivité. L'élimination de l'analyte dans le système permet de revenir à la ligne de base.

### 4.2.3 Intérêt de l'utilisation des auto-assemblages GbLFY-SAM

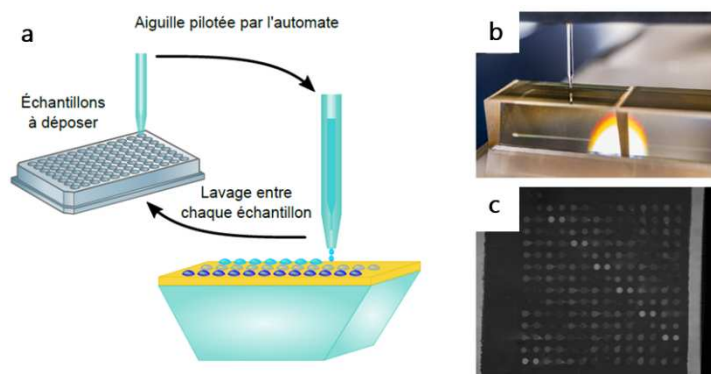
L'utilisation des auto-assemblages de GbLFY-SAM pour la détection de COV dans le dispositif SPRi en phase gaz repose à nouveau sur la nanostructuration de la surface. En effet, cette dernière, pourrait permettre d'augmenter la surface spécifique dans les dispositifs SPRi et ainsi diminuer la limite de détection des COV. La première idée a été la création de nanopiliers d'or en utilisant comme support les auto-assemblages GbLFY-SAM. Dans le Chapitre 3, nous avons montré que les recherches concernant la création de nanostructures en or en utilisant GbLFY-SAM ou les mutants manquaient de maturité ce qui n'a pas permis d'obtenir un prisme opérationnel permettant d'explorer cette voie.

Un paramètre important dans l'utilisation de la nanostructuration de surface pour la SPR est la régularité de cette topographie. Or, nous avons montré dans le Chapitre 2 que les auto-assemblages de GbLFY-SAM ayant une hauteur 31 nm reposent sur un film protéique organisé qui recouvre entièrement toute la surface. Cet empilement de structure ne peut pas être utilisé tel quel dans un dispositif SPR. En effet, pour une surface donnée, nous avons des zones présentant une hauteur de 31 nm et d'autres zones ayant une hauteur plus faible. D'un point de vue du signal SPR qui pourrait découler de cette structure hétérogène, nous aurions un moyennage du signal et donc une perte de sensibilité. Les premières expériences pour essayer de contraindre la croissance des auto-assemblages de 31 nm n'ayant pas abouti à la formation d'une couche homogène, nous nous sommes intéressés à l'organisation du film protéique organisé sur les prismes de SPR pour pouvoir par la suite évaluer ses performances dans la détection de COV.

## 4.2.4 Détection de COV par SPR grâce à l'auto-assemblage de GbLFY-SAM

### 4.2.4.1 Spotting des auto-assemblages sur le prisme de SPR

La première étape de ces expériences a été l'auto-assemblage de GbLFY-SAM à la surface du prisme en or. Le principe général de la technique de « *spotting* » est l'utilisation d'un robot de dépôt qui permet de déposer des gouttes de l'ordre du nL à la surface du prisme (Figure 4.10) aboutissant à la formation de plot. En amont de ce dépôt, la surface en or subit un traitement par un plasma O<sub>2</sub> pendant 24h qui permet à la fois de nettoyer la surface métallique mais aussi de l'oxyder de manière homogène.

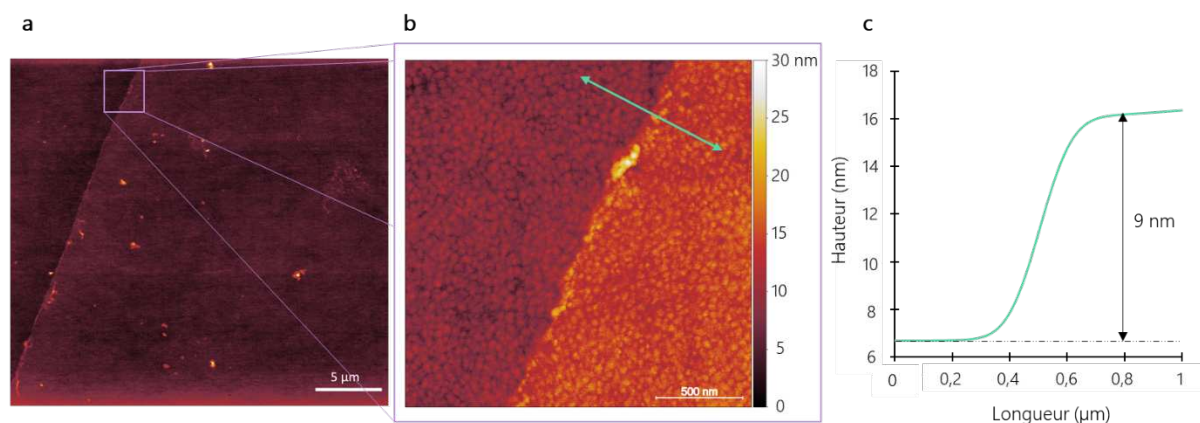


**Figure 4.10 :** Le spotting des sondes par un automate (a) sur un prisme en or (b) permet d'obtenir un champ de dépôt composé de plots correspondants aux différentes sondes utilisées (c). Schéma tiré et adapté de la référence<sup>350</sup>.

Les solutions protéiques mélangées au tampon d'auto-assemblage (20 mM Tris-HCl pH 8,0 / 315 mM de sulfate d'ammonium / 1 mM TCEP / 5% glycérol) sont alors déposées grâce à l'automate sur la surface du prisme. Le glycérol est présent d'une part pour éviter l'évaporation trop rapide de la solution déposée mais aussi pour empêcher les gouttes de s'étendre sur la surface du prisme et ainsi obtenir des plots bien définis spatialement. Les protéines utilisées ici sont GbLFY-SAM ainsi que GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> afin d'avoir une première évaluation du comportement d'un mutant cystéine sur une surface en or. En effet, du fait de la présence de la cystéine et de l'affinité entre la fonction thiol de la cystéine et l'or, il se peut qu'il y ait un changement dans le phénomène d'auto-assemblage. De plus, le but ici est d'obtenir une surface uniquement recouverte du film protéique organisé en s'affranchissant des auto-assemblages présentant une hauteur d'une trentaine de nm. Or, il est supposé que l'utilisation d'une concentration élevée en protéines aboutira à la formation d'un nombre plus important de ces auto-assemblages. Ainsi, différentes concentrations protéiques ont été testées. Après le dépôt des solutions sur le prisme, ce dernier est inséré dans une chambre humide contenant le tampon d'auto-assemblage. Cette chambre est alors scellée pendant 24H laissant le processus d'auto-assemblage se réaliser. Ce procédé est identique à celui utilisé, et décrit précédemment, pour les grilles de microscopie et conduit au film protéique organisé. En revanche, ces conditions aboutissent également à la formation des auto-assemblages de 31 nm. Ainsi, à la fin des 24h d'auto-assemblage, le prisme est nettoyé abondamment avec de l'eau pour décrocher les auto-assemblages de 31 nm du film protéique organisé. Ceci devrait aboutir à l'obtention d'une surface uniquement recouverte du film protéique organisé. L'image du champ de dépôt réalisé sur le prisme après nettoyage est présentée dans les annexes Figure 7.4.

### 4.2.4.2 Caractérisation des auto-assemblages par AFM

Suite à l'utilisation de l'automate pour spotter les auto-assemblages, il a fallu s'assurer de la bonne formation du film protéique organisé à la surface du prisme. En effet, il est possible que l'utilisation du robot de dépôt et/ou la surface d'or aient un effet sur les capacités d'auto-assemblage des protéines. Nous avons donc étudié la topographie de ces plots. Le prisme étant en verre, les plots ont été caractérisés grâce à l'AFM. Un exemple de caractérisation d'un plot de GbLFY-SAM /C = 1,25 mg.mL<sup>-1</sup> est présenté dans la Figure 4.11.



**Figure 4.11 :** Exemple de la caractérisation d'un bord d'un plot d'auto-assemblage de GbLFY-SAM /C = 1,25 mg.mL<sup>-1</sup>. La vue d'un champ large du plot (a) montre qu'il reste encore quelques débris protéiques adsorbés sur le film protéique organisé. Le zoom sur la frontière entre le bord et la surface du prisme (b) montre qu'il y a un pas de hauteur qui pourrait correspondre au film protéique organisé. Ce saut de hauteur (c) est mesuré et correspondrait à une hauteur de 9 nm soit 12 protéines empilées.

Plusieurs plots ont été observés en AFM. D'une manière générale, il reste encore des débris protéiques et ce quel que soit la concentration protéique utilisée. Le nettoyage du prisme est donc à revoir. Il pourrait être envisagé de faire baigner le prisme dans l'eau voire dans le tampon d'auto-assemblage. Il a cependant été possible d'observer un saut de hauteur qui pourrait correspondre au film protéique organisé en caractérisant le bord des plots (Figure 4.11.b). L'effet granuleux du film protéique sur la Figure 4.11.b est dû à la granulosité de l'or. D'un point de vue du phénomène d'auto-assemblage, ce film protéique présente une hauteur d'environ 9 nm (Figure 4.11.c) ce qui pourrait correspondre à un pas d'hélice supramoléculaire soit 12 protéines empilées. Cependant, les images AFM ne permettent pas de déterminer si ce film protéique est organisé comme nous avons pu l'observer en STEM. Cette réponse pourrait être apportée par l'utilisation d'autres techniques d'AFM comme l'AFM liquide ou l'AFM *high speed*. Par ailleurs, nous pourrions aussi appuyer l'organisation de ce film protéique en utilisant un mutant de GbLFY-SAM qui n'est pas capable de s'oligomériser afin de vérifier que, dans ce cas-là, il n'y a pas ce saut de 9 nm de haut.

#### 4.2.4.3 Choix de l'angle de travail

Afin de tester la détection de COV grâce au film protéique de GbLFY-SAM, l'angle de travail a été défini en comparant les courbes plasmons de chaque condition testée. Ces courbes sont présentées dans la Figure 4.12.

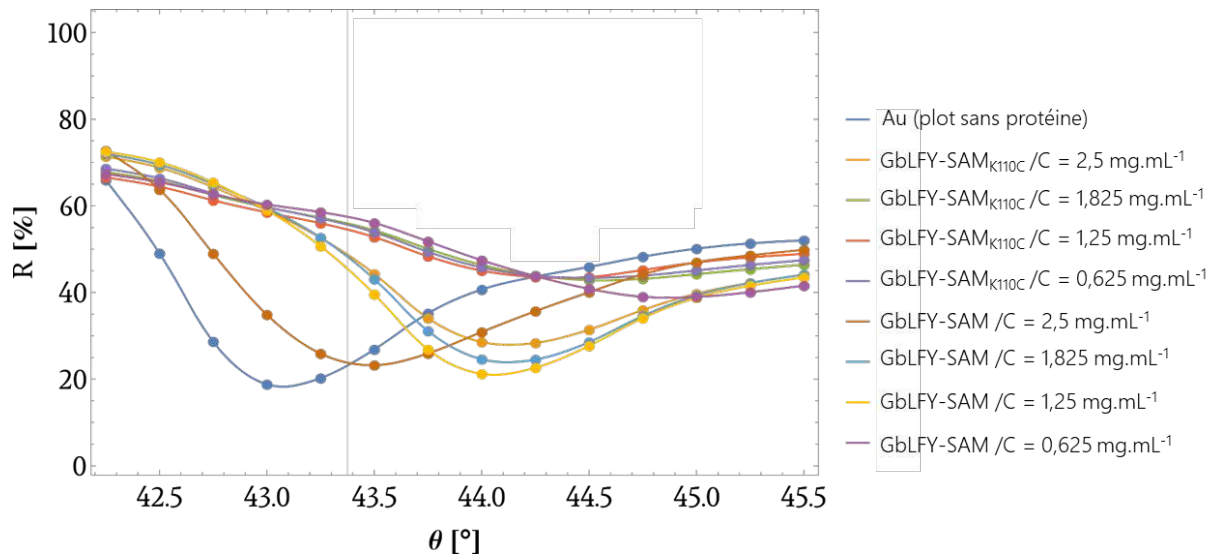
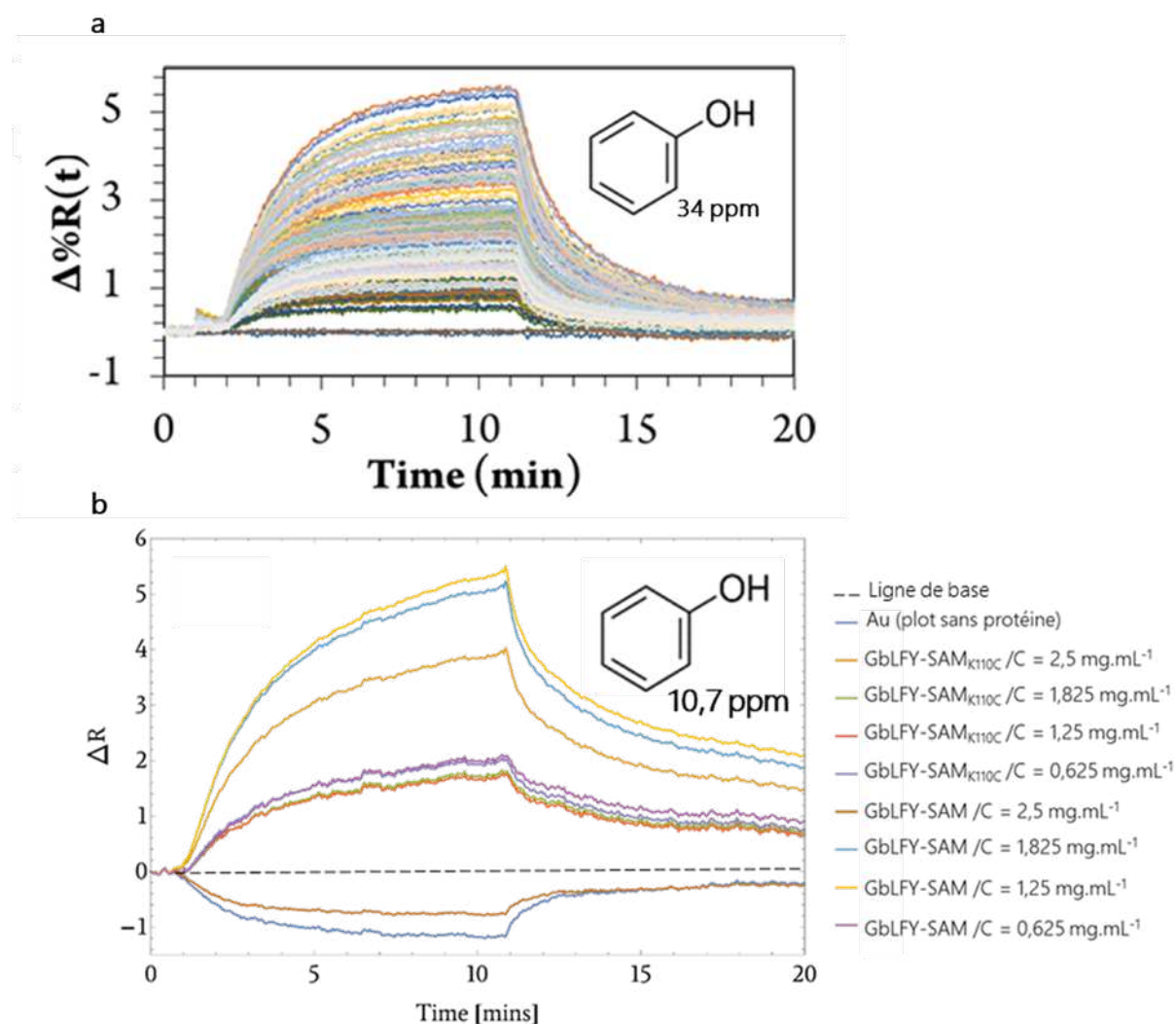


Figure 4.12 : Comparaison entre les courbes plasmons des différentes conditions testées.

La forme des courbes plasmons est très différente d'un plot à un autre avec un décalage par rapport à la surface nue (plot Au). Ce qui signifie qu'il y a un dépôt de matière sur la surface du prisme : les films protéiques. La mesure de la différence de réflectivité par la suite dépend de la sensibilité du plot c'est-à-dire la différence entre le maximum de réflectivité et le minimum. Pour les quatre courbes les plus en haut (GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> /C = 1,825 mg.mL<sup>-1</sup>, GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> /C = 1,25 mg.mL<sup>-1</sup>, GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> /C = 0,625 mg.mL<sup>-1</sup> et GbLFY-SAM /C = 0,625 mg.mL<sup>-1</sup>), la différence entre ce maximum et ce minimum est d'environ 30% au lieu presque 50% pour la surface nue. A cause de cette perte de sensibilité, nous savons d'ores et déjà qu'il sera difficile d'obtenir une condition exploitable en SPR pour ces quatre conditions. Du fait de la forme des courbes, le choix d'un unique angle de travail implique forcément de travailler avec des sensibilités non optimales pour chaque plot. Le choix a donc été de privilégier les plots qui présentent une différence de réflectivité plus importante (les plots GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> /C = 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>, GbLFY-SAM /C = 1,825 mg.mL<sup>-1</sup> et GbLFY-SAM /C = 1,25 mg.mL<sup>-1</sup>). Il est aussi à noter que, du fait de ce choix d'angle de travail, les courbes plasmons correspondantes aux plots en or et GbLFY-SAM /C = 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> auront un signe différent des autres dans les suivis SPRi présentés ci-après.

#### 4.2.4.4 Détection de COV : le phénol

Nous avons ensuite étudié la sensibilité du système en détectant du phénol. Le phénol est une molécule qui est dérivée des déchets pouvant se retrouver dans l'eau de ville et présente des risques aussi bien pour l'Homme que pour la nature<sup>356</sup>. Par exemple, le phénol est une nuisance produisant des odeurs parasites dans le vin<sup>357</sup> mais il est aussi un marqueur des cancers gastroesophagiens<sup>358</sup>. Au sein de l'équipe CREAB, un précédent eNose a été fabriqué pour détecter, entre autres, le phénol grâce à l'utilisation de peptides<sup>351</sup>. Afin d'évaluer la réponse du film protéique de GbLFY-SAM, nous avons reproduit le même type d'expérience. Les résultats préliminaires obtenus sont présentés dans la Figure 4.13.

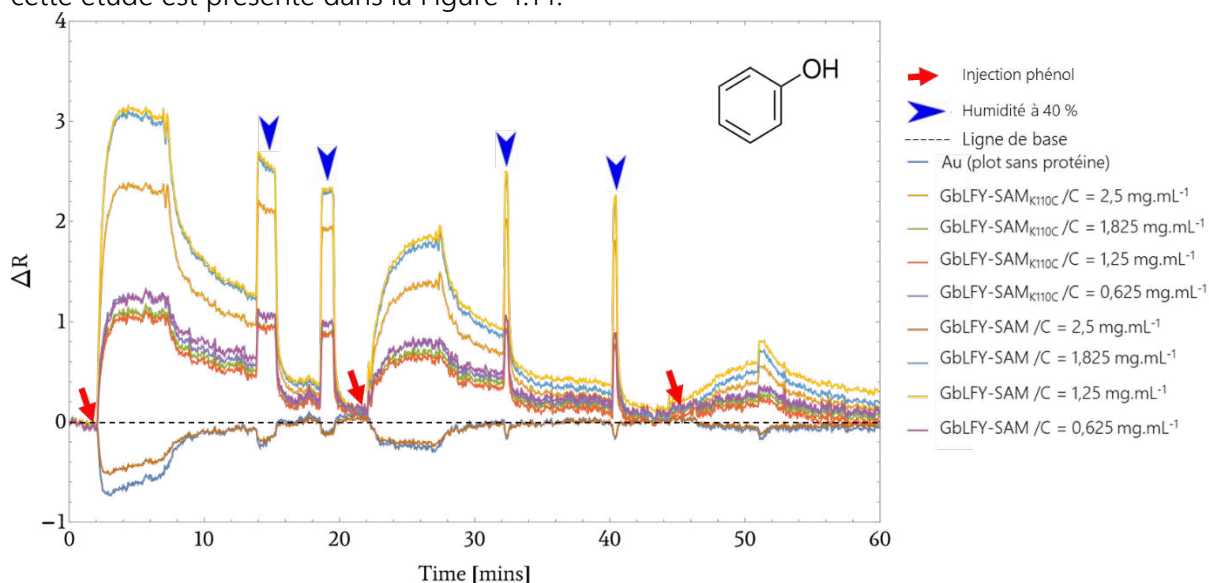


**Figure 4.13 :** Comparaison entre le système basé sur des peptides spécifiques déjà existant permettant la détection du phénol (a) et le système développé au cours de ma thèse basé sur le film protéique de GbLFY-SAM (b). Les ppm inscrits dans les graphiques ont été mesurés grâce au détecteur PpbRAE 3000. Le graphique (a) est tiré de la référence<sup>351</sup>.

La mise en contact du phénol avec les auto-assemblages GbLFY-SAM produit un changement de réflectivité qui atteint, pour les plots GbLFY-SAM /C = 1,825 mg.mL<sup>-1</sup> et GbLFY-SAM /C = 1,25 mg.mL<sup>-1</sup>, le même pourcentage que les meilleurs peptides développés au laboratoire alors que la concentration en phénol est trois fois plus faible (34 ppm pour les peptides contre 10,7 ppm pour les auto-assemblages). Cela montre que même sans affinité spécifique, le fait de nanostructurer la surface par les auto-assemblages GbLFY-SAM permet d'augmenter la sensibilité du système. Du fait de la diminution de la réflectivité des plots GbLFY-SAM<sub>K110C</sub>, il est difficile d'interpréter les résultats obtenus. Il est aussi à noter que le retour à la ligne de base dans le cas des auto-assemblages se fait sur un laps de temps plus long que dans le cas des peptides. Ceci est problématique car cela signifie que du phénol est toujours emprisonné dans les auto-assemblages ce qui aura des conséquences sur la régénération du prisme pour des mesures successives.

#### 4.2.4.5 Régénération des auto-assemblages par augmentation de l'humidité

Dans le système SPR gaz développé dans le laboratoire, une partie de l'optimisation du système a reposé sur le contrôle du taux d'humidité dans l'enceinte de mesure<sup>353</sup>. En effet, lorsque des sondes biologiques comme des peptides ou des protéines se trouvent dans un environnement humide, les molécules d'eau s'adsorbent à leur surface ce qui peut diminuer leur potentiel de capture des molécules d'intérêt. Dans l'expérience présentée juste avant, le taux d'humidité était fixé à 3%. Nous nous sommes alors demandé si l'augmentation de l'humidité pourrait permettre au phénol de mieux se désorber des auto-assemblages par un effet de remplacement par les molécules d'eau. Ainsi, des injections successives de phénol ont été réalisées avec, entre chaque injection, l'augmentation de l'humidité jusqu'à 40%. Le résultat de cette étude est présenté dans la Figure 4.14.



**Figure 4.14 :** L'augmentation de l'humidité du système à 40% (flèches bleues) après injection du phénol (flèches rouges) permet de faire revenir le signal de différence de la réflectivité à la ligne de base montrant qu'il est possible de régénérer le prisme pour l'utiliser plusieurs fois.

Pour la première injection de phénol, le retour à la ligne de base ne semble pas être atteignable avant un temps long comme il a déjà été observé dans la Figure 4.13. L'augmentation de l'humidité du système à 40% permet d'accélérer le phénomène de désorption du phénol. Le système revient alors à la ligne de base et une nouvelle injection peut être effectuée. Il est à noter que la troisième injection a été effectuée avec une concentration en phénol telle que l'appareil PpbRAE 3000, un détecteur de COV normalisé qui joue le rôle de contrôle, n'a rien détecté. Pourtant, nous observons un saut de réflectivité au niveau des plots des auto-assemblages ce qui signifie qu'il y a bien eu injection de phénol et que sa concentration est inférieure à la limite de détection de l'appareil PpbRAE 3000 soit de l'ordre du ppt.

#### 4.2.5 Conclusion

Dans cette seconde partie, nous avons montré qu'il était possible d'adresser physiquement l'auto-assemblage GbLFY-SAM sur un prisme de SPR en verre recouvert avec une couche d'or. La formation du film protéique à la surface a été caractérisée par AFM révélant une hauteur de 9 nm. Ce film protéique a permis de détecter des quantités de phénol jusqu'au ppt, seuil de détection en dessous de ce qui a été développé jusqu'à présent au CREAB. Par ailleurs, il pourrait être envisagé de tester les autres COV présentés dans Brenet et al.<sup>351</sup> pour voir si ceux-ci se comportent de la même manière que le phénol lorsqu'ils sont mis en contact avec le film protéique de GbLFY-SAM. Ces résultats sont encourageants dans la poursuite de l'utilisation du

film protéique de GbLFY-SAM. Cependant, nous manquons d'informations sur celui-ci. Nous pouvons nous demander si cet adressage physique par le robot de dépôt permet de garantir l'organisation en nid d'abeille du film protéique. Les expériences AFM réalisées sur le prisme ne permettent pas de répondre à cette question. S'il s'avère que ce film protéique n'est pas organisé à la surface du prisme, alors il pourrait être intéressant d'étudier les auto-assemblages de 31 nm car leur hauteur pourrait compenser leur dispersion sur la surface et ainsi augmenter la sensibilité du système.



## Conclusion générale et perspectives

"What I want to talk about is the problem of manipulating and controlling things on a small scale." Cette phrase, prononcée par Richard Feynman en 1959<sup>359</sup>, concernait les avancées nécessaires aux technologies *top-down* mais elle illustre aussi très bien les techniques *bottom-up* médiées par les mécanismes d'auto-assemblage. Ceux-ci permettent un contrôle fin de structures ordonnées à l'échelle nanométrique. Prédire finement l'organisation de ces nanostructures mais aussi leurs conditions d'obtention sont toujours un challenge surtout lorsqu'on rajoute les interactions surface-structure au système. Ces remarques sont particulièrement pertinentes lorsqu'on s'intéresse aux auto-assemblages protéiques. Ces auto-assemblages sont de plus en plus décrits et étudiés dans la littérature car, leur nature protéique, les rendent intrinsèquement stables et résistants dans des conditions physiologiques. Ils peuvent être facilement fonctionnalisables et sont modulables par l'introduction d'acides aminés spécifiques. Malgré ces propriétés engageantes, la majorité des auto-assemblages décrits résultent en la construction d'une monocouche protéique organisée présentant de ce fait peu de sites greffages. Ces deux caractéristiques sont des freins dans leur utilisation pour des applications nanotechnologiques.

C'est dans ce contexte qu'est né mon projet de thèse. La résolution de la structure de la protéine GbLFY-SAM par la technique des rayons X sur des cristaux 3D en solution a révélé une capacité d'oligomérisation par des interactions tête-queue formant ainsi une structure en nid d'abeille présentant des motifs inférieurs à 10 nm. L'utilisation de cet auto-assemblage en nid d'abeille de GbLFY-SAM pour nanostructurer des surfaces présente notamment l'intérêt d'atteindre un nombre de site de greffage jamais décrits auparavant. Nous avons cherché à déterminer si les auto-assemblages de GbLFY-SAM pouvaient être utilisés comme des plateformes de greffage. Ce grand objectif était découpé en trois grandes questions :

- 1) Est-il possible de faire croître cette nanostructure sur une surface ?
- 2) La modification de la protéine entraîne-t-elle une modification de la structure en nid d'abeille ?
- 3) Cet auto-assemblage a-t-il un intérêt dans le cadre d'application dans le domaine des biocapteurs ?

Nous avons alors montré que la structure en nid d'abeille était conservée même lorsqu'une large partie de la protéine (partie C- terminale ou partie N- terminale) était remplacée ou raccourcie. Cependant, les conditions d'obtention des auto-assemblages mutants ont nécessité de nombreuses mises au point et la répétabilité des opérations nécessite une grande rigueur. Il a été néanmoins possible de montrer que nous pouvions avoir une métallation spécifique des pores des auto-assemblages grâce aux ions  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  et du contour de ceux-ci avec les ions  $\text{Au}^{3+}$ . La croissance de ces auto-assemblages a aussi été un point clé dans cette thèse. Nous avons montré que GbLFY-SAM était capable de former un film protéique organisé d'une hauteur d'environ 9 nm et que ce film recouvrait entièrement la grille de microscopie. Par-dessus ce film, la protéine est aussi capable de former des auto-assemblages présentant une hauteur plus élevée de 31 nm. La capacité de chélation des ions  $\text{Cu}^{2+}$  a ensuite été mise à profit pour réaliser un système de détection de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour des applications de biocapteurs à glucose. Bien que ces expériences préliminaires nécessitent plus d'investigations, la preuve de concept du fonctionnement de ce système a été établie. Par ailleurs, l'utilisation du film protéique organisé pour détecter le phénol de l'ordre du ppt par un système de biocapteur SPRi gaz ouvre la voie à

l'utilisation des auto-assemblages GbLFY-SAM pour nanostructurer des surfaces. L'ensemble de ces résultats est présenté schématiquement dans la Figure 5.1.

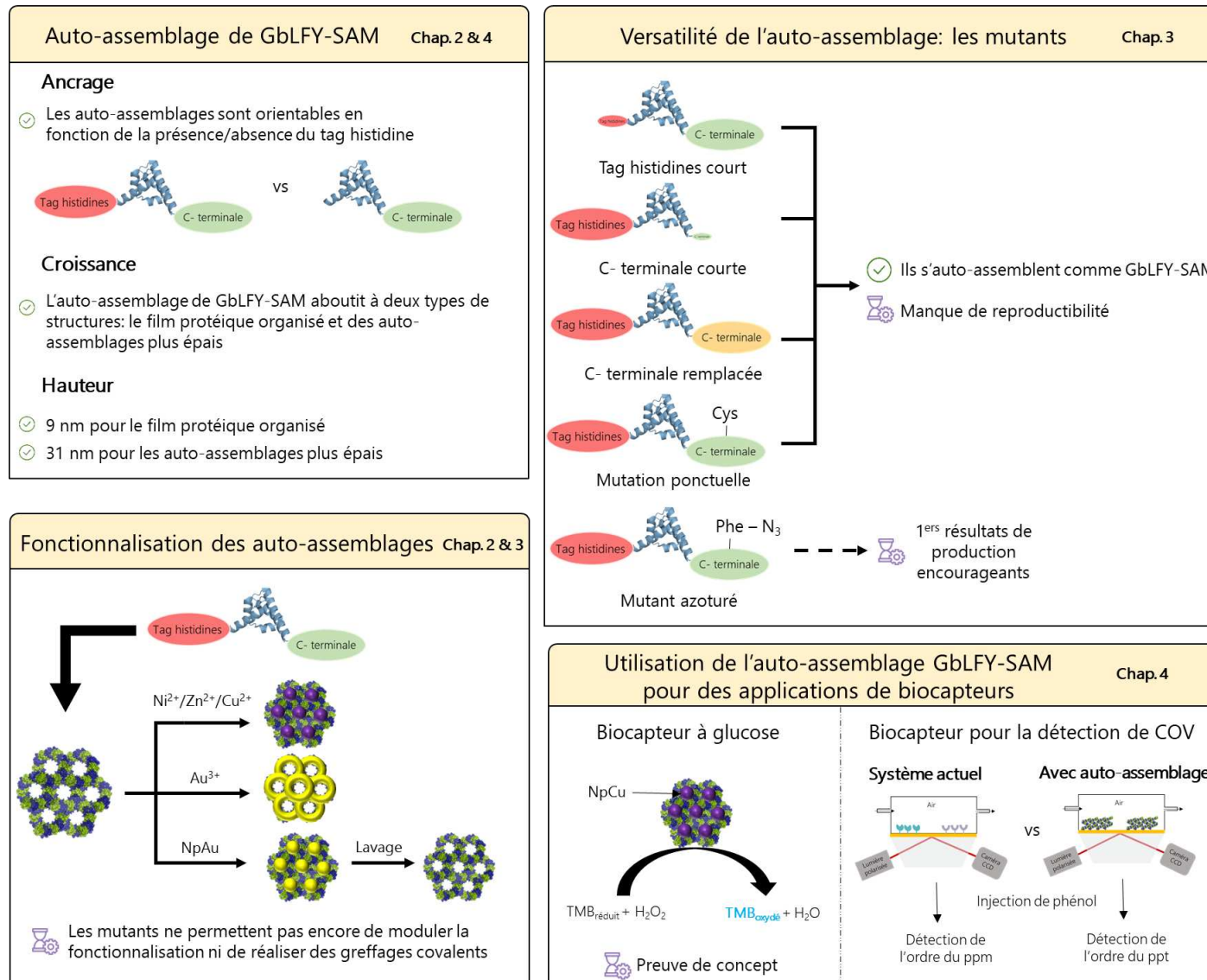
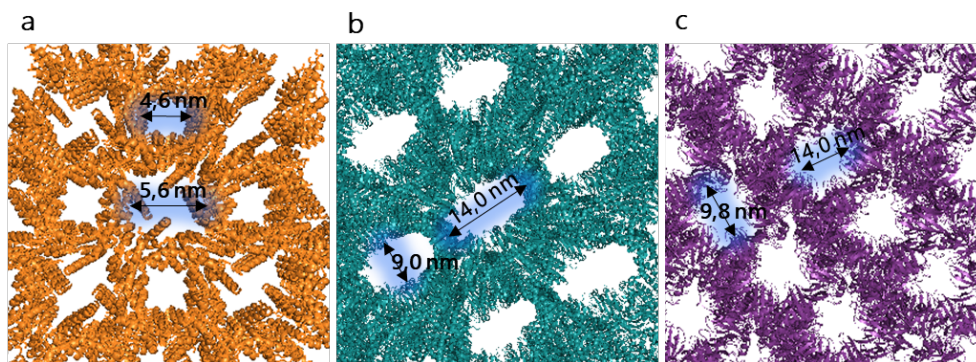


Figure 5.1 : Vue d'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse.

Nous allons maintenant aborder des pistes de développement qu'il est possible d'envisager pour la suite de ce projet.

Il y a encore quelques points d'optimisation concernant la formation des auto-assemblages de GbLFY-SAM sur surface. Nous avons mesuré une hauteur constante et moyenne de 31 nm. Or, en solution les cristaux 3D ont une taille qui atteint le demi-millimètre. Nous pouvons alors nous demander s'il est possible d'augmenter la hauteur des auto-assemblages sur surface. La différence entre la protéine utilisée pour obtenir les cristaux en 3D et la protéine utilisée pour obtenir les auto-assemblages sur surface est la présence du tag histidines. Il est alors possible que la présence de ce tag arrête la croissance de l'auto-assemblage sur surface. L'ajout de la protéine ne comportant pas de tag histidines sur une première couche auto-assemblée avec le tag n'a pas permis d'observer une augmentation de la hauteur. Il est aussi possible que cette hauteur reste constante car il y a un équilibre qui s'est formé entre les protéines en solution et les protéines qui se sont auto-assemblées sur la grille. Lorsqu'une grille, sur laquelle une première couche auto-assemblée a été formée, est mise en contact avec une nouvelle goutte protéine/tampon d'auto-assemblage, la croissance des auto-assemblages ne se fait pas en continue. L'augmentation de la hauteur des auto-assemblages n'est pas envisageable en utilisant cette approche. Il pourrait alors être envisagé d'augmenter le temps d'auto-assemblage en se rapprochant plutôt des temps de cristallisation des cristaux en solution qui sont de l'ordre de la semaine.

Le tag histidines étant responsable de l'ancrage perpendiculaire de l'auto-assemblage de GbLFY-SAM, il pourrait être intéressant de tester si d'autres domaines protéiques utilisant eux aussi des interactions tête-queue pour oligomériser adoptent ce comportement d'ancrage perpendiculaire lorsqu'on leur ajoute le tag. Nous pourrions alors obtenir une diversité de pores tant par la taille que par la forme comme présenté dans la Figure 5.2. Il peut être imaginé d'avoir, sur une même surface, des zones distinctes présentant les divers motifs de ces protéines tout cela dans le but de les utiliser en tant que masques de nanolithographie pour la microélectronique. Cela permettrait d'aboutir à une complexification de la structuration de la surface pour se rapprocher au maximum des circuits intégrés qu'il est possible d'obtenir actuellement. Par ailleurs, l'utilisation de telles structures pourraient être avantageuse pour greffer des composés plus volumineux que des nanoparticules ou des quantum dots comme des molécules colorées utilisées dans les cellules solaires à colorant.



**Figure 5.2 :** Exemple d'autres réseaux mésoporeux qu'il serait possible d'obtenir en utilisant le domaine SAM de la Caskin1 (a, PDB : 3SEI), le domaine PB1 de ARF5 (b, PDB : 4CHK) ou encore le domaine DIX de Dvl2 (c, PDB : 4WIP). Ces réseaux sont obtenus par auto-assemblage des protéines en utilisant des interactions tête-queue.

Au cours de ma thèse, nous avons essayé de contraindre la croissance des auto-assemblages en créant dans un premier temps un moule sur la surface grâce au FIB. Mais, la présence du film

protéique organisé empêche d'envisager cette solution car il recouvre l'intégralité de la surface. Dans un premier temps, il devra être envisagé d'étudier la croissance de ce film protéique afin de s'assurer de son organisation quelle que soit la surface utilisée notamment par des techniques d'AFM *high speed* ou liquide. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer si ce film protéique est présent chez les mutants en réalisant, avec eux, des expériences sur les grilles Quantifoil®. Si le film protéique est organisé quelle que soit la surface utilisée, il pourrait alors être intéressant d'utiliser un banc de Langmuir pour déterminer quelle est l'aire maximale pouvant être occupée par le film protéique organisé. Dans le cas où le film protéique n'est pas organisé, le banc de Langmuir pourrait être une voie de sortie pour obtenir une convergence des auto-assemblages de 31 nm que ce soit pour GbLFY-SAM ou pour les mutants.

Les points évoqués précédemment permettraient une compréhension plus fine de la manière dont GbLFY-SAM s'auto-assemble sur les surfaces. D'une manière générale, nous cherchons à pouvoir adapter la hauteur des auto-assemblages ainsi que leur étendue en fonction des applications visées. Par exemple, la hauteur de 9 nm du film protéique organisé est suffisante pour les applications de SPR. En revanche, cette hauteur n'est pas adaptée si l'on souhaite utiliser les auto-assemblages GbLFY-SAM dans le cadre d'applications photovoltaïques. Pour ces applications, plus la surface spécifique est élevée, meilleur sera le rendement de la cellule solaire. Par ailleurs, si nous arrivons à allier une hauteur importante et une large surface recouverte, la métallisation de ces structures pourrait être utile pour viser des applications de catalyse comme le *water splitting*. Cette réaction permet, à partir de l'eau, d'obtenir du dihydrogène, molécule phare dans l'utilisation d'énergie plus verte. En alliant à la fois une hauteur de film protéique organisé plus importante et une couche homogène, nous pourrions aboutir à des structures, par exemple métalliques, qui permettraient d'augmenter le rendement de cette réaction. A titre d'exemple, il a été montré que les nanoparticules de platine, de palladium ou encore d'argent<sup>360</sup> permettent de réaliser le *water splitting*. Nous pouvons alors imaginer des petits réacteurs dont l'intérieur serait nanostructuré par les auto-assemblages GbLFY-SAM permettant ainsi la production de H<sub>2</sub>.

L'étude des mutants doit aussi être poursuivie. Les mutants azoturés semblent être la meilleure voie à explorer dans l'utilisation d'auto-assemblages mutants. Ces mutants pourraient être utilisés pour greffer des nanoparticules d'or à l'intérieur des pores en utilisant la réaction entre le DBCO et l'azoture. L'idée est, à nouveau, de créer des nanopiliers d'or à l'intérieur des pores pour augmenter les signaux par exemple SPR mais aussi SERS (surface-enhanced Raman scattering). Si nous arrivons à montrer que ces protéines mutantes sont capables de s'auto-assembler sur surface comme GbLFY-SAM et que le greffage covalent de molécules à l'intérieur des pores est possible, nous pourrions envisager d'utiliser d'autres acides aminés non canoniques afin d'élargir la chimie qu'il sera possible d'utiliser pour fonctionnaliser les auto-assemblages. Ceci montrera à nouveau la versatilité de cet auto-assemblage protéique en nid d'abeille.

Dans une perspective à plus long terme, il pourrait être envisagé d'inclure les peptides développés au CREAB en partie C- terminale qui reconnaissent spécifiquement certains types de COV. Nous pourrions alors profiter de l'augmentation de la surface spécifique apportée par les auto-assemblages GbLFY-SAM mais aussi de la spécificité de ces peptides pour obtenir des dispositifs très sensibles. Ces modifications entraîneraient certainement des modifications au niveau des conditions d'auto-assemblages comme nous avons pu le voir dans mes travaux de thèse. Néanmoins, nous avons montré qu'il était possible, mais chronophage, d'obtenir cette structure en nid d'abeille en ajustant les paramètres comme la concentration en CAPS-NaOH et en NaCl. A l'instar des mutants présentés dans ma thèse, l'inclusion par voie génomique des séquences codantes pour ces peptides pourrait aboutir à une structure tertiaire entraînant des gênes stériques ou des modifications au niveau des liaisons ne permettant pas d'assurer un auto-

assemblage correct. Il est aussi possible que la recherche de conditions d'auto-assemblages n'aboutisse pas. Il pourrait alors être envisagé d'utiliser les mutants azoturés pour lier les peptides aux auto-assemblages.

Les perspectives entourant mes travaux de thèse sont nombreuses et les résultats présentés ici sont, pour la plupart, préliminaires tout en restant très encourageants pour la poursuite de l'utilisation de ces auto-assemblages dans des applications en nanotechnologie.



## Matériels et méthodes

### 6.1 Production et purification des protéines

#### 6.1.1 Plasmides utilisés

Les séquences codantes pour les protéines ont été insérées dans deux types de plasmides, le pETM11 ou le pET30a(+) (annexe Figure 7.1). Le premier permet l'addition d'un tag histidines et d'un site de clivage à la protéase TEV (*Tobacco Etch Virus*) suivant : MKHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGA en N-terminale de la séquence protéique de GbLFY-SAM. Le second offre la possibilité de modifier ce tag histidines. Ainsi, les séquences codantes pour les mutants de la partie C- terminale ont été clonées dans des pETM11 en utilisant les enzymes de restrictions NcoI et XhoI. Les séquences codantes pour les mutants de la partie N- terminale ont été clonées dans des pET30a(+) en utilisant les enzymes de restrictions NdeI et XhoI. La synthèse des séquences codantes pour les protéines ainsi que leur clonage dans les plasmides ont été réalisés par ShineGene (Shanghai, Chine). Ces plasmides ont un gène de résistance à la kanamycine, un antibiotique, ce qui permet de sélectionner les bactéries les ayant incorporés.

#### 6.1.2 Préparation des plasmides

Les plasmides synthétisés par l'entreprise ShineGene arrivent déshydratés et en faible quantité. Au préalable de la production des protéines, une étape de surproduction des plasmides est réalisée. Ce qui permet à la fois d'obtenir des plasmides en grande quantité mais aussi de créer un stock glycérol permettant de sauvegarder le plasmide utilisé. Après avoir resuspendu le plasmide dans 50  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  autoclavée, 2  $\mu\text{L}$  sont ajoutés à des bactéries *E. coli* DH5 $\alpha$  (50  $\mu\text{L}$ ). Le tout est laissé pendant 45 min sur glace. Un choc thermique (42°C, 1 min) est alors réalisé pour incorporer le plasmide dans la bactérie. Elles sont ensuite remises sur glace pendant 5 min. Elles sont reprises avec 950  $\mu\text{L}$  de milieu Luria-Bertani (LB, Roth) et laissées sous agitation à 37°C pendant 1h. La solution est ensuite étalée sur une boîte de LB-Agar (Roth) contenant de la kanamycine (50  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) afin de sélectionner les bactéries ayant incorporées le plasmide. La boîte est laissée à incuber à 37°C sur la nuit. Le lendemain, une colonie est récupérée pour inoculer 5 mL de LB contenant de la kanamycine (50  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ). Les bactéries sont laissées à pousser pendant la nuit à 37°C sous agitation. 750  $\mu\text{L}$  de cette solution sont récupérés et mélangés à 750  $\mu\text{L}$  de glycérol 30% pour constituer le stock glycérol qui est conservé à -80°C. Le reste de la culture est alors centrifugé à 6000 g pendant 5 min à température ambiante puis le protocole du kit d'extraction QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) est suivi. La concentration du plasmide est ensuite mesurée à l'aide d'un NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific). Les plasmides sont conservés à -20°C.

#### 6.1.3 Production des protéines

Au cours de mes travaux de recherche, deux types de production protéique ont été réalisés. La première ne nécessite que l'incorporation d'un plasmide comportant la séquence d'ADN codant pour la protéine d'intérêt. La seconde, utilisée uniquement dans le cas du mutant protéique azoturé (GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>), a nécessité l'incorporation de deux plasmides. Les deux sections suivantes permettront de préciser les différences concernant ces deux productions.

### 6.1.3.1 Pour toutes les protéines produites sauf GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>.

2 µL de plasmide surproduit (soit environ 80 ng) sont mis en contact avec 50 µL d'*E. coli* Rosetta 2 (DE3) pendant 45 min sur glace. Un choc thermique (42°C, 1 min) est alors réalisé pour incorporer le plasmide dans la bactérie. Elles sont ensuite remises sur glace pendant 5 min. Elles sont reprises avec 950 µL de milieu LB et laissées sous agitation à 37°C pendant 1h. La solution est ensuite étalée sur une boîte de LB-Agar contenant de la kanamycine (50 µg.mL<sup>-1</sup>) et du chloramphénicol (34 µg.mL<sup>-1</sup>). L'ajout de ces deux antibiotiques permet d'une part de sélectionner les bactéries qui ont incorporé le plasmide codant pour la protéine d'intérêt. D'autre part, les *E. coli* Rosetta 2 (DE3) possèdent déjà un plasmide (pRARE) qui leur confère une résistance au chloramphénicol. Ce plasmide code pour 7 ARN de transfert pour des codons rares normalement peu utilisés chez *E. coli*. Cela permet d'avoir une traduction universelle des protéines peu importées par l'organisme dont elles sont issues. La boîte est laissée à incuber à 37°C sur la nuit. Le lendemain, plusieurs colonies sont récupérées et mises dans 10 mL de LB contenant de la kanamycine (50 µg.mL<sup>-1</sup>) et du chloramphénicol (34 µg.mL<sup>-1</sup>). Les bactéries sont laissées à pousser pendant 2h à 37°C sous agitation. Cette pré-culture est alors ajoutée à 1 L de LB contenant de la kanamycine (50 µg.mL<sup>-1</sup>) et du chloramphénicol (34 µg.mL<sup>-1</sup>). La culture est laissée à 37°C sous agitation jusqu'à obtenir une DO<sub>600nm</sub> entre 0,6 et 0,8. Puis la température est abaissée à 18°C pendant 1h avant l'induction par 0,4 mM d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). L'induction envoie aux bactéries compétentes le signal de production de la protéine d'intérêt. Après une croissance sur la nuit, les bactéries sont centrifugées (4000 rpm, rotor JLA 8.1 (Beckman) / 4°C / 45 min) puis le culot est lavé avec 50 mL de tampon 100 mM Tris-HCl (2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol) pH 8,0. Le culot resuspendu est séparé en 4 (4 x ¼ de culot) puis recentrifugé (3000 g / 4°C / 15 min) avant d'être congelé à -80°C.

### 6.1.3.2 Pour le mutant GbLFY-SAM<sub>AzF</sub>

La souche bactérienne utilisée est *E. coli* BL21(DE3) (New England Biolabs). Au 2µL du plasmide surproduit sont ajoutés 2 µL du plasmide pEVOL-AzF, un don de Peter Schultz (Addgene # 31186 ; <http://n2t.net/addgene:31186> ; RRID:Addgene\_31186). Le volume final de la culture est de 250 mL au lieu de 1 L. Aussi, l'induction est réalisée par 0,4 mM d'IPTG, 2 mM 4-azido-L-phenylalanine (AzF, ChemCruz) et 0,04% (m/v) de L-Arabinose (Sigma-Aldrich). La suite de la production est identique aux autres protéines.

## 6.1.4 Purification des protéines

Pour ¼ de culot, 50 mL de tampon de solubilisation sont préparés. Ce tampon ainsi que les autres tampons utilisés au cours de ces purifications varient en fonction des protéines. La composition détaillée de ces tampons est précisée dans le tableau 6.1. Le ¼ de culot est resuspendu dans 35 mL du tampon approprié puis passé aux ultrasons (Sonifier 250, Branson) pendant 5 min (1 pulse on pour 2 pulse off) à 60% d'amplitude. Le volume de la solution est alors complété jusqu'à 50 mL (fraction brute) puis une étape de centrifugation est réalisée (12 000 rpm, rotor JA20 (Beckman) / 45 min / 4°C). Le surnageant (fraction soluble) est transféré sur une colonne contenant 3 mL de résine Ni-Sepharose High Performance (Cytiva) équilibrée avec le tampon approprié en fonction de la protéine purifiée. Cette étape permet de retenir les protéines possédant des acides aminés affins pour le Ni<sup>2+</sup> en particulier les histidines du tag ajouté en N-terminale de la protéine. Une fois que le surnageant est passé au travers de la résine (fraction flowthrough), celle-ci est lavée avec 20 mL du tampon de lavage approprié (fraction wash). Ceci permet de faire se désorber les contaminants qui n'ont pas le tag histidines. L'élution s'effectue alors grâce à 3 x 3 mL de tampon d'élution (fraction d'élution 1, 2 et 3 respectivement). Ce tampon

est riche en imidazole ce qui est suffisant pour rentrer en compétition avec les histidines du tag et permet de décrocher les protéines d'intérêts de la résine.

Nom de la protéine	Tampon de dénaturation	Tampon d'équilibration	Tampon de lavage	Tampon d'élution
GbLFY-SAM GbLFY-SAM <sub>K110C</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 mM Tris HCl pH 8,0</li> <li>• 1 mM TCEP</li> <li>• 1 comprimé inhibiteur de protéase**/50 mL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 mM Tris HCl pH 8,0</li> <li>• 1 mM TCEP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 mM Tris HCl pH 8,0</li> <li>• 1 mM TCEP</li> <li>• 20 mM imidazole</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 mM Tris HCl pH 8,0</li> <li>• 1 mM TCEP</li> <li>• 300 mM imidazole</li> </ul>
GbLFY-SAM <sub>(GGS)2</sub> <sub>C</sub> GbLFY-SAM <sub>(CH)3</sub> <sub>C</sub> GbLFY-SAM <sub>(GGS)2</sub> <sub>(CH)3</sub> <sub>C</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2 M CAPS*** pH 10,5</li> <li>• 0,5 M NaCl</li> <li>• 5 mM TCEP</li> <li>• 1 comprimé inhibiteur de protéase**/50 mL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2 M CAPS pH 10,5</li> <li>• 0,5 M NaCl</li> <li>• 5 mM TCEP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2 M CAPS pH 10,5</li> <li>• 0,5 M NaCl</li> <li>• 5 mM TCEP</li> <li>• 20 mM imidazole</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2 M CAPS pH 10,5</li> <li>• 0,5 M NaCl</li> <li>• 5 mM TCEP</li> <li>• 300 mM imidazole</li> </ul>
GbLFY-SAM <sub>Midas-11</sub> GbLFY-SAM <sub>AzF</sub> GbLFY-SAM <sub>N-ter</sub> <sub>court*</sub> GbLFY-SAM <sub>N-ter</sub> <sub>très court*</sub> GbLFY-SAM <sub>C-ter</sub> <sub>court*</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2 M CAPS pH 10,5</li> <li>• 0,5 M NaCl</li> <li>• 1 mM TCEP</li> <li>• 1 comprimé inhibiteur de protéase**/50 mL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2 M CAPS pH 10,5</li> <li>• 0,5 M NaCl</li> <li>• 1 mM TCEP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2 M CAPS pH 10,5</li> <li>• 0,5 M NaCl</li> <li>• 1 mM TCEP</li> <li>• 20 mM imidazole</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2 M CAPS pH 10,5</li> <li>• 0,5 M NaCl</li> <li>• 1 mM TCEP</li> <li>• 300 mM imidazole</li> </ul>

**Tableau 6.1 :** Récapitulatif des tampons utilisés lors des purifications protéiques en fonction de la protéine étudiée. \*Protéines mutantes décrites dans l'article uniquement. \*\* Pierce™ EDTA free (ThermoFischer). \*\*\* CAPS : acide N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonique.

Afin de vérifier la pureté des protéines purifiées, des électrophorèses sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes sont réalisées (SDS-PAGE). A 12 µL des fractions brute, soluble, flowthrough et wash sont ajoutés 4 µL de tampon de charge (0,2M Tris-HCl pH 6,8 / 40 % glycérol / 4 % SDS / 1,54% DTT / 0,1% bleu de Bromophénol). A 6 µL des fractions d'élution 1, 2 et 3 sont ajoutés 2 µL de tampon de charge. Les fractions sont laissées à chauffer à sec à 100°C pendant 5 min. Elles sont alors déposées sur un gel SDS-PAGE 15% en acrylamide puis les protéines sont laissées à migrer pendant 45 min à 25 mA. Les bandes protéiques sont révélées par du bleu de Coomassie (Instant Blue, Expedeon). Ce gel permet de déterminer quelle fraction d'élution est mise en dialyse contre un tampon identique au tampon d'équilibration sur la nuit. Les gels d'électrophorèse de chaque production protéique réalisés sont présentés dans les Annexes (Figure 7.2). La concentration de la protéine purifiée est mesurée à l'aide d'un NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific) en utilisant les paramètres de poids moléculaire et de coefficients moléculaires détaillés dans le tableau 6.2 et déterminés en utilisant l'outil ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Si la concentration est inférieure à 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> alors la protéine est concentrée grâce à un filtre d'ultracentrifugation Amicon Ultra (Merck) jusqu'à obtenir *a minima* cette concentration. La concentration s'effectue par des centrifugations (4 000

g, 15 min, 4°C) successives. La solution protéique est alors divisée en aliquots de 20 ou 40 µL puis ils sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

Nom de la protéine	Séquence protéique complète	Poids moléculaire (Da)	Coefficient d'extinction molaire (cm <sup>-1</sup> .M <sup>-1</sup> )
GbLFY-SAM	MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAM ARKESSLEELFRHYGVRYMTLTKMVEMGF TVNTLVNMTEQELDDVIRTLVDIYRVDLLV GEKYGKSAVRAEKRRLELERKKLDFVDV DGKRKADENALDLSQA	15 812	8940
GbLFY-SAM <sub>K110C</sub>	MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAM ARKESSLEELFRHYGVRYMTLTKMVEMGF TVNTLVNMTEQELDDVIRTLVDIYRVDLLV GEKYGKSAVRAEKRRLELERCKLDFVDV DGKRKADENALDLSQA	15 839	8940
GbLFY-SAM <sub>(GGG)2 C</sub>	MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAM ARKESSLEELFRHYGVRYMTLTKMVEMGF TVNTLVNMTEQELDDVIRTLVDIYRVDLLV GEKYGKSAVRAEKRRLELERKKGGSGGS C	13701	8940
GbLFY-SAM <sub>(CH)3 C</sub>	MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAM ARKESSLEELFRHYGVRYMTLTKMVEMGF TVNTLVNMTEQELDDVIRTLVDIYRVDLLV GEKYGKSAVRAEKRRLELERKKGCHCHC HC	14077	8940
GbLFY-SAM <sub>(GGG)2 (CH)3 C</sub>	MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAM ARKESSLEELFRHYGVRYMTLTKMVEMGF TVNTLVNMTEQELDDVIRTLVDIYRVDLLV GEKYGKSAVRAEKRRLELERKKGGSGGS CHCHCHC	14422	8940
GbLFY-SAM <sub>Midas-11</sub>	MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAM ARKESSLEELFRHYGVRYMTLTKMVEMGF TVNTLVNMTEQELDDVIRTLVDIYRVDLLV GEKYGKSAVRAEKRRLELERKKGGSTGT SVLIATPGV	14495	8940
GbLFY-SAM <sub>AzF</sub>	MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAM ARKESSLEELFRHYGVRYMTLTKMVEMGF TVNTLVNMTEQELDDVIRTLVDIYRVDLLV GEKYGKSAVRAEKRRLELERKKDLA <sub>Z</sub> FV DVDGKRKADENALDLSQA	15 812	8940
GbLFY-SAM <sub>N-ter court</sub> *	MKHHHHHHHPGAMARKESSLEELFRHYG VRYMTLTKMVEMGFTVNTLVNMTEQELD	13 993	5960

	DVIRTLVDIYRVDLLVGEKYGIKSAVRAEKR RLDELERKKLDFVDVDGKRKADENALDTL SQA		
GbLFY-SAM <sub>N-ter très court</sub> *	MHHHHHHGAMARKELSSLEELFRHYGVR YMTLTKMVEMGFTVNTLVNMTEQELDDV IRTLVDIYRVDLLVGEKYGIKSAVRAEKRRR DELERKKLDFVDVDGKRKADENALDTLS QA	13 768	5960
GbLFY-SAM <sub>C-ter court</sub> *	MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAM ARKESSLEELFRHYGVRYMTLTKMVEMGF TVNTLVNMTEQELDDVIRTLVDIYRVDLLV GEKYGIKSAVRAEKRRRLELERKKLDA	13 495	8940

**Tableau 6.2 :** Récapitulatif des séquences en acides aminés, du poids moléculaire ainsi que du coefficient d'extinction molaire des protéines produites au cours de cette thèse. \*Protéines mutantes décrites dans l'article uniquement.

### 6.1.5 Remplacement du tampon de purification

Pour les protéines purifiées dans un tampon 0,2 M CAPS pH 10,5 / 0,5 M NaCl / 1 ou 5 mM TCEP, un remplacement de tampon afin de diminuer la concentration en CAPS et en NaCl est effectué en utilisant une chromatographie d'exclusion stérique sur une FPLC (*Fast protein liquid chromatography*, Akta purifier, GE Healthcare). La colonne utilisée est une Superdex-200 16/60 (GE Healthcare). Le tampon d'équilibration de la colonne est 40 mM CAPS pH 10,5 / 50 mM NaCl / 1 mM ou 5 mM TCEP. 1 mL de la fraction d'élution obtenue lors de la purification est injectée sur la colonne puis éluée avec le même tampon que celui d'équilibration avec un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Les fractions correspondantes à la protéine (autour d'un volume d'élution de 80 mL en fonction de la taille de la protéine) sont récupérées puis elles sont concentrées grâce à un filtre d'ultracentrifugation Amicon Ultra (Merck) (4000 g / 10 min / 4°C) jusqu'à obtenir *a minima* une concentration de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Elles sont ensuite divisées en aliquots de 20 ou 40 µL puis congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C. Les chromatogrammes sont présentés en Annexe (Figure 7.3 et 7.4).

## 6.2 Caractérisation du nid d'abeille formé par GbLFY-SAM

### 6.2.1 Auto-assemblage sur surface

Le principe d'auto-assemblage des protéines GbLFY-SAM est basé sur le phénomène de vapeur diffusion en goutte assise utilisé pour obtenir des cristaux protéiques 3D en solution (Chapitre 2, Figure 2.1). La goutte est composée de 6 µL de solution protéique 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> et 12 µL de tampon d'auto-assemblage tandis que le réservoir est rempli uniquement avec le tampon d'auto-assemblage. La composition du tampon d'auto-assemblage majoritairement utilisé dans mes travaux est la suivante : 20 mM Tris-HCl pH 8,0 / 1 mM TCEP / 315 mM de sulfate d'ammonium. Sur le dessus de la goutte est déposée une grille de microscopie 200 meshes en or recouverte d'un film carbone amorphe de 20 à 30 nm (01840G-F, TedPella), une grille SiO<sub>2</sub> (So100-G-Flat, SiMPore) ou encore une grille Quantifoil® (660-200-Au, TedPella). Dans tous les cas, elles ont été préalablement nettoyées grâce à un plasma glow discharge (Courdouan Technologies) pendant 40 s à 2 mA sous une pression de 2.10<sup>-1</sup> mbar. Ce plasma utilisant l'air ambiant comme gaz, cela permet d'hydrophyliser la surface de la grille afin d'augmenter sa mouillabilité.



### 6.2.3 Mesure de la hauteur par AFM et analyse des scans

Les mesures d'AFM ont été réalisées dans l'air directement soit sur les grilles de microscopie en carbone soit sur les wafers de silicium en utilisant le mode ScanAsyst®, un mode semi-automatique de PeakForce Tapping, sur un Dimension XR AFM (Bruker). Toutes les mesures ont été réalisées avec des ScanAsyst-Air-HPI (Bruker) composé d'un cantilever en Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> et d'une pointe ayant un diamètre entre 2 et 12 nm. Les images sont acquises avec une résolution de 1024 lignes avec une vitesse de balayage entre 0,2 et 0,5 Hz.

L'analyse des scans a été réalisée en utilisant le logiciel Gwyddion (<http://gwyddion.net/>). Dans un premier temps, les données sont remises à niveau en soustrayant le plan moyen. Puis, si nécessaire, les marques horizontales présentes sur le scan sont corrigées. Ensuite, un filtre « minimum » est appliqué au scan avant que la base soit aplanie et la hauteur minimum fixée à 0 nm. La mesure de la hauteur se fait par l'extraction de profil le long d'une ligne tracée manuellement d'une largeur de 15 pixels sur le scan. Par la suite, l'utilisation d'une fonction d'ajustement permet d'extraire la valeur de la hauteur.

## 6.3 Fonctionnalisation des auto-assemblages

### 6.3.1 Sels de métaux et réduction

La fonctionnalisation des auto-assemblages en utilisant des ions métalliques a été réalisée juste après leur auto-assemblage sur les surfaces. Les métaux testés sont Ni<sup>2+</sup> (NiCl<sub>2</sub>, Hampton Research), Au<sup>3+</sup> (HAuCl<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich), Cu<sup>2+</sup> (CuNO<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich) et Zn<sup>2+</sup> (ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich). Pour chaque métal, différents équivalents par rapport au nombre de moles de protéines utilisées pour l'auto-assemblage ont été testés. Une goutte de 18 µL est formée en mélangeant le volume correspondant aux équivalents et de l'eau MilliQ. Les paramètres optimaux pour les ions Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> sont 30 équivalents (1,6 mM) en ions pendant 5 min et 10 équivalents (0,52 mM) pendant 5 min pour Au<sup>3+</sup>.

Après l'étape de mise en contact avec les ions métalliques, la grille est séchée par capillarité pour enlever l'excédent d'ions. La réduction des ions métalliques est réalisée en déposant la grille de microscopie électronique sur une goutte de 18 µL d'une solution de NaBH<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) correspondant à 20 équivalents par rapport aux ions métalliques, soit une solution à une concentration de 32 mM. L'excédent de NaBH<sub>4</sub> est aussi enlevé par capillarité.

### 6.3.2 Fonctionnalisation avec les nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or (Monomaleimido undecagold, Nanoprobes) utilisées pour la fonctionnalisation des auto-assemblages présentent un diamètre de 2 nm et sont greffées avec une fonction maléimide. Les 10 nmol de nanoparticules en or contenues dans le tube commercial sont dispersées dans 200 µL d'eau MilliQ. Après avoir laissé les protéines s'auto-assembler pendant 24h, une goutte de 18 µL est formée en mélangeant 9,5 µL du tube commercial avec 8,5 µL d'H<sub>2</sub>O (2 équivalents / [Nanoparticules] = 26 µM). Le couplage entre les nanoparticules et les auto-assemblages est laissé pendant 1h puis les grilles sont séchées par capillarité ou déposées à nouveau sur une goutte de 18 µL d'H<sub>2</sub>O si la grille doit être lavée.

### 6.3.3 Analyse EDX des auto-assemblages fonctionnalisés

Les spectres EDX des échantillons qui ont été métallés ont été acquis sur un microscope Tecnai Osiris (FEI) utilisé en mode STEM. Pour ces expériences-là, le voltage est de 200 kV. Les spectres ont été acquis grâce au détecteur Super X Detector (Bruker) en utilisant le logiciel Esprit (Bruker). Une région d'intérêt (*i.e.* un auto-assemblage) est définie sur l'image et le spectre correspondant est acquis pendant 5 min. L'identification des éléments présents dans la région définie se fait tout

d'abord en mode automatique, puis, si des pics apparaissent mais qu'ils ne sont pas annotés, l'annotation se fait manuellement.

## 6.4 Réaction entre le TMB et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> médiée par les CuNp dans les auto-assemblages GbLFY-SAM

Dans un premier temps, le processus d'auto-assemblage de GbLFY-SAM sur grille de carbone est réalisé comme présenté dans la section 6.2.1. Puis, les CuNp sont créées *in situ* en utilisant la procédure décrite en 6.3.1 en utilisant 30 équivalents en Cu<sup>2+</sup>. Entre l'étape d'auto-assemblage sur les grilles et la mise en contact avec les ions métalliques, la grille n'est ni rincée ni séchée. Le 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (TMB, Sigma-Aldrich) est dilué dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich) pour obtenir une solution à 1 M. La solution de peroxyde d'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich) est à 30% soit [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 9,79 M. Le mix réactionnel est préparé au dernier moment.

Dans le cas de l'évaluation de l'intérêt de la nanostructuration de surface par les auto-assemblages GbLFY-SAM, le mix est composé de [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = [TMB] = 20 mM et 50 mM de tampon acétate pH 4,2. 4 µL de ce mix sont déposés sur la grille de carbone avec ou sans les auto-assemblages fonctionnalisés avec les CuNp. Après 20 min de catalyse, le mix est homogénéisé et l'absorbance est mesurée à 652 nm sur un NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific) en réalisant 2 mesures de 2 µL.

La cinétique de la réaction est mesurée en utilisant des grilles différentes à t=30s, 3 min, 6 min, 9 min, 12 min, 15 min, 20 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min et 150 min. Le mix réactionnel et les mesures d'absorbances sont identiques aux conditions décrites ci-dessus. La variation de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été réalisée en diluant le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le tampon 50 mM de tampon acétate pH 4,2 et en ajoutant le volume correspondant dans le mix réactionnel

## 6.5 Détection du phénol par SPRI

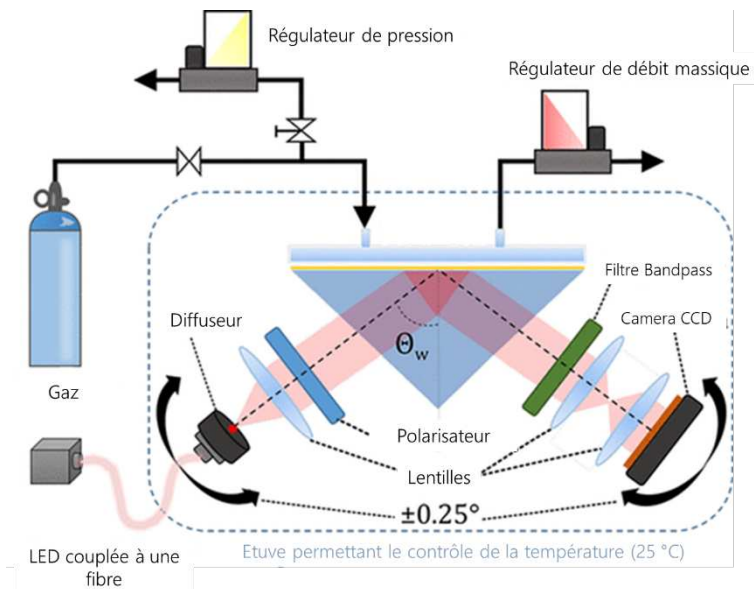
### 6.5.1 Spotting des auto-assemblages sur un prisme en verre

Un prisme en verre NBK7® (Edmund optics) est recouvert d'abord par 2 nm de chrome et puis par 53 nm d'or grâce à un évaporateur à faisceau d'électrons (MEB550-S, Plassys). Il est ensuite nettoyé en utilisant un plasma Femto (Diener Electronic) en utilisant un mélange 75% O<sub>2</sub> / 25 % Ar à 0,6 mbar pour générer un plasma à 80W pendant 3 min. Le prisme est ensuite laissé 48h dans un environnement scellé pour que la surface reste propre et pour réduire son hydrophilicité.

La création des plots sur le dessus du prisme a été réalisée à l'aide de l'automate de dépôt sciFLEXARRAYER (Scienon). Pour chaque protéine GbLFY-SAM et GbLFY-SAM<sub>K110C</sub> 4 concentrations ont été testées : 2,5 / 1,825 / 1,25 / 0,625 mg.mL<sup>-1</sup>. Une solution d'auto-assemblage 20 mM Tris-HCl pH 8,0 / 315 mM de sulfate d'ammonium / 1 mM TCEP / 5% glycérol est préparée. A partir des lots de protéines purifiées et concentrées tel que décrit dans la section 6.1.4., des mélanges contenant 20 µL de la protéine à la concentration décrite ci-dessus et 40 µL de solution d'auto-assemblage sont réalisés juste avant le spotting. Des gouttes de 5 nL sont réalisées et chaque condition est réalisée en triplicat. Après le dépôt des solutions, le prisme est mis dans une chambre humide contenant la solution d'auto-assemblage pendant 24h à 20°C afin de permettre le processus de vapeur diffusion. Le prisme est ensuite retourné et rincé dans de l'eau avant d'être séché en utilisant de l'Ar.

### 6.5.2 Mesures SPRI

Le prisme est inséré dans le système SPRI gaz présenté en Figure 6.1. Chaque plot d'auto-assemblage est défini, sur l'image, par un cercle de 350  $\mu\text{m}$  de diamètre au centre de chaque plot. L'angle de travail est alors déterminé en déplaçant manuellement le diffuseur de 0,25° entre 42° et 45° par rapport à la surface en or. A chaque déplacement, nous obtenons une mesure de réflectivité qui nous permet de remonter aux courbes présentées dans le Chapitre 4 Figure 4.12. Ces courbes correspondent à la moyenne de chaque triplicat réalisé par condition.



**Figure 6.1 :** Représentation schématique du dispositif SPRI gaz fabriqué sur mesure au CREAB. Figure tirée et traduite de la référence<sup>354</sup>.

Le phénol (50 mg) est alors dissout dans 4 mL d'huile minérale (Sigma Aldrich) dans une fiole en verre hermétique et connectée au système fluide. Le mélange est homogénéisé pendant 2 min. Les vapeurs de ce mélange sont injectées pendant 5 min dans le circuit fluide qui passe au niveau de la surface du prisme. La quantité exacte de phénol injectée est déterminée grâce au détecteur PpbRAE 3000 (RAE), un détecteur de COV normalisé. Par un système de purge, le phénol peut être éliminé du système fluide en injectant de l'air propre pendant 5 min. Par ailleurs, une colonne de charbon permet de réguler l'humidité de l'air injecté. Ce système permet de maintenir l'humidité aux alentours de 3%. En ne faisant pas circuler l'air dans cette colonne, l'humidité de l'air peut être augmentée.



## Annexes

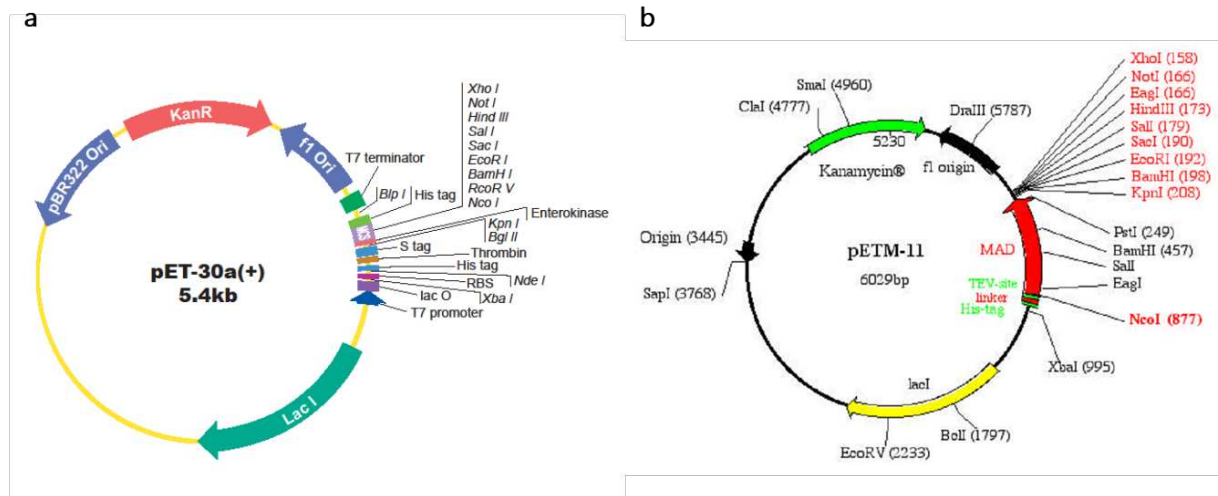


Figure 7.1 : Carte du plasmide pET30a(+) (a) et du plasmide pETM11 (b) utilisés pour produire les protéines de ma thèse.

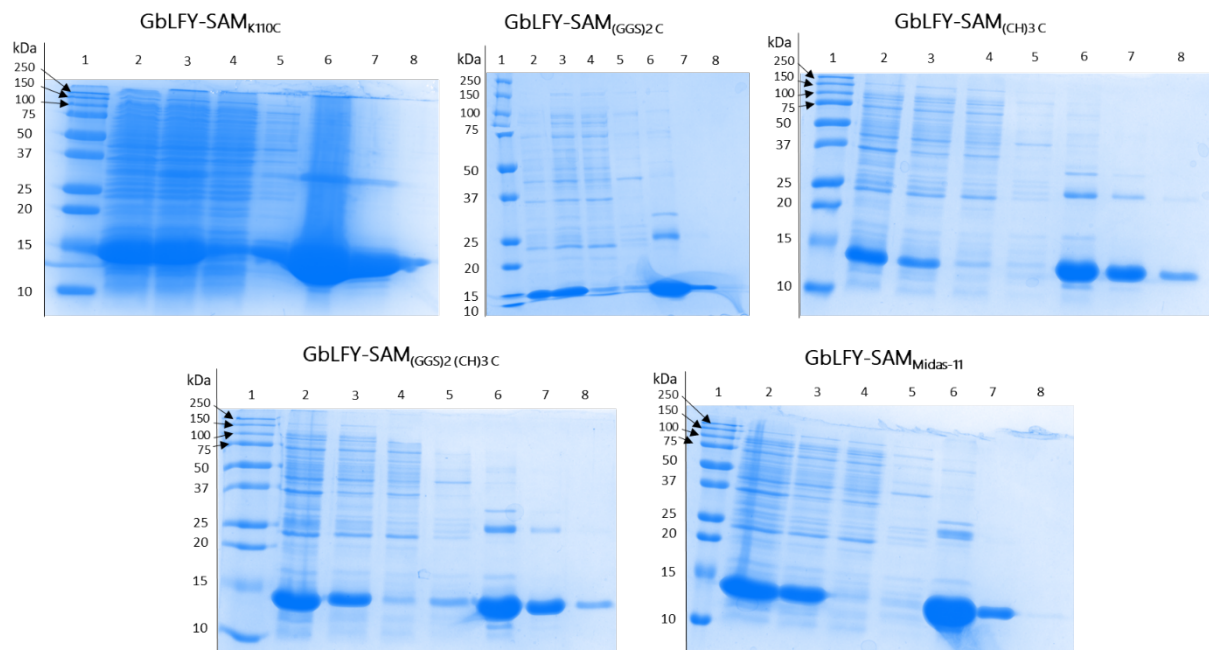


Figure 7.2 : Gels de contrôle SDS-PAGE pour chaque mutant purifié coloré par le bleu de Coomassie. Puits n°1 : marqueurs de poids moléculaire. Puits n°2 : Fraction brute. Puits n°3 : Fraction soluble. Puits n°4 : Fraction « flowthrough ». Puits n°5 : Fraction « wash ». Puits n°6 : Fraction d'éluion 1. Puits n°7 : Fraction d'éluion 2. Puits n°8 : Fraction d'éluion 3.

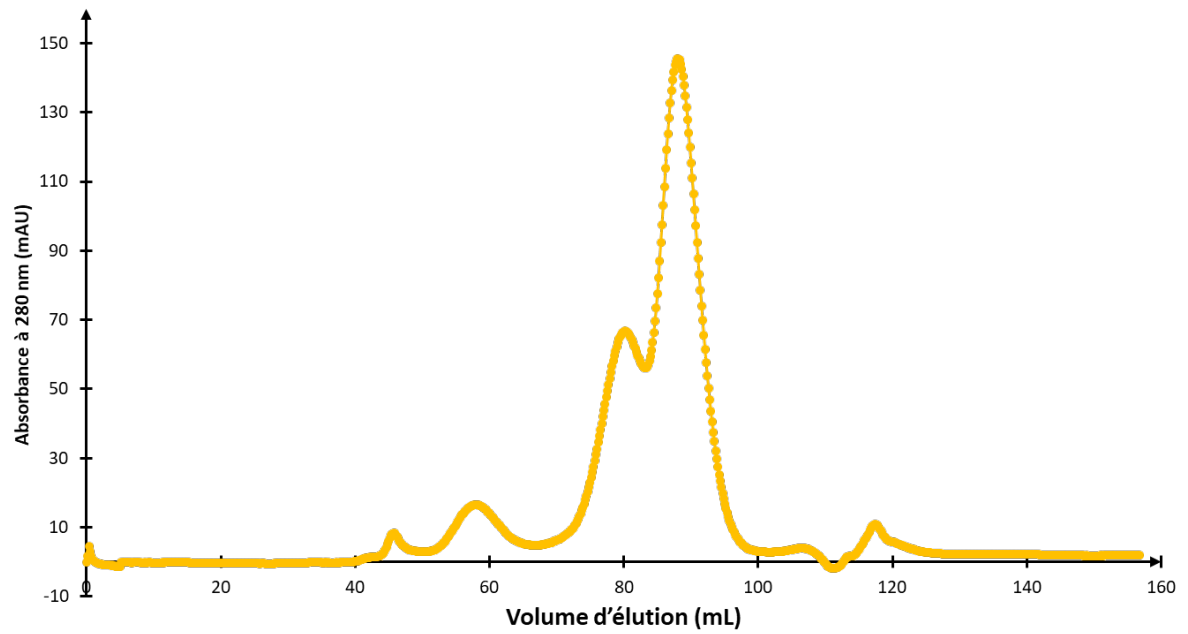


Figure 7.3 : Profil chromatographique pour le mutant GbLFY-SAM<sub>(GGS)<sub>2</sub>(CH)<sub>3</sub> C.</sub>

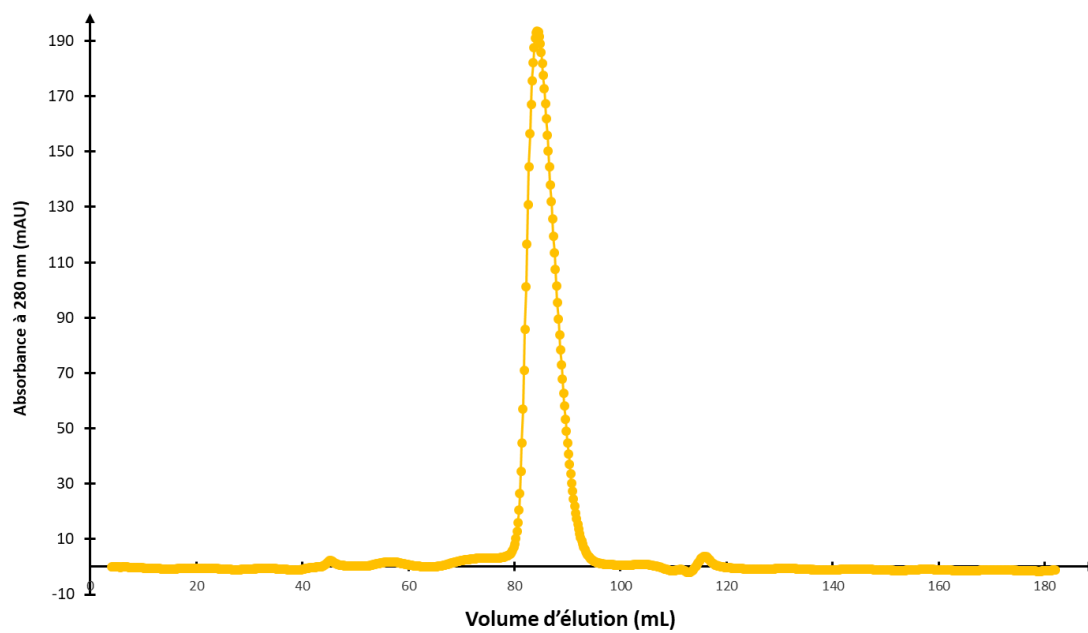
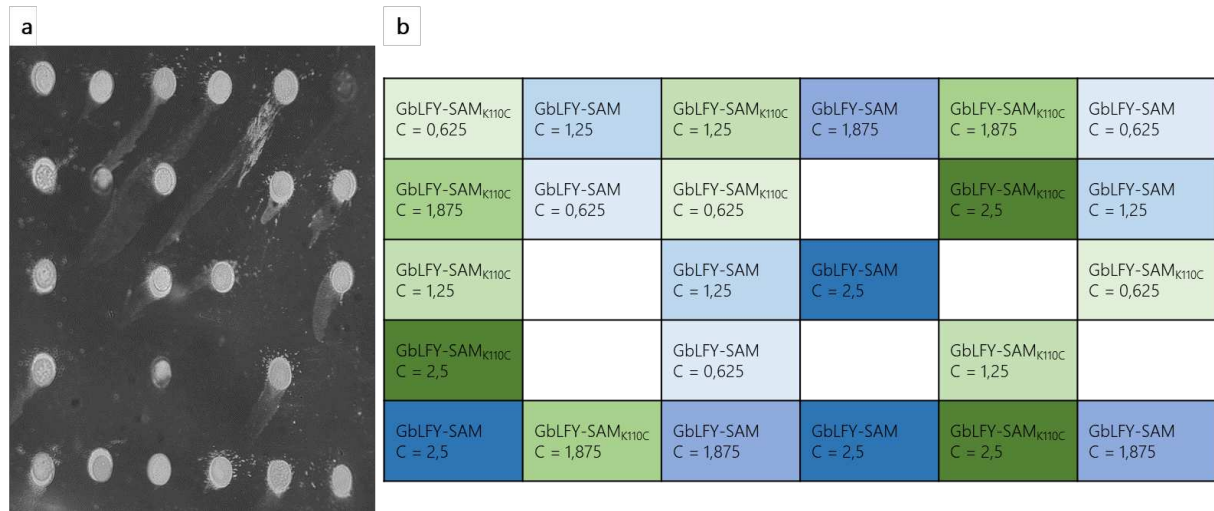


Figure 7.4 : Profil chromatographique pour le mutant GbLFY-SAM<sub>Midas-11</sub>.



**Figure 7.5 :** Image du prisme SPR (a) et plan de dépôt correspondant (b). C correspond à la concentration de la protéine en  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

## Références

- (1) Yadav, S.; Sharma, A. K.; Kumar, P. Nanoscale Self-Assembly for Therapeutic Delivery. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 127. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00127>.
- (2) Su, Z.; Zhang, R.; Yan, X.-Y.; Guo, Q.-Y.; Huang, J.; Shan, W.; Liu, Y.; Liu, T.; Huang, M.; Cheng, S. Z. D. The Role of Architectural Engineering in Macromolecular Self-Assemblies via Non-Covalent Interactions: A Molecular LEGO Approach. *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *103*, 101230. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2020.101230>.
- (3) Wakabayashi, R.; Higuchi, A.; Obayashi, H.; Goto, M.; Kamiya, N. PH-Responsive Self-Assembly of Designer Aromatic Peptide Amphiphiles and Enzymatic Post-Modification of Assembled Structures. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (7), 3459. <https://doi.org/10.3390/ijms22073459>.
- (4) Jiang, J.; Jacobs, A. G.; Wenning, B.; Liedel, C.; Thompson, M. O.; Ober, C. K. Ultrafast Self-Assembly of Sub-10 Nm Block Copolymer Nanostructures by Solvent-Free High-Temperature Laser Annealing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (37), 31317–31324. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b00774>.
- (5) Morkved, T. L.; Lu, M.; Urbas, A. M.; Ehrichs, E. E.; Jaeger, H. M.; Mansky, P.; Russell, T. P. Local Control of Microdomain Orientation in Diblock Copolymer Thin Films with Electric Fields. *Science* **1996**, *273* (5277), 931–933. <https://doi.org/10.1126/science.273.5277.931>.
- (6) Ariga, K.; Nishikawa, M.; Mori, T.; Takeya, J.; Shrestha, L. K.; Hill, J. P. Self-Assembly as a Key Player for Materials Nanoarchitectonics. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2019**, *20* (1), 51–95. <https://doi.org/10.1080/14686996.2018.1553108>.
- (7) Gong, C.; Sun, S.; Zhang, Y.; Sun, L.; Su, Z.; Wu, A.; Wei, G. Hierarchical Nanomaterials via Biomolecular Self-Assembly and Bioinspiration for Energy and Environmental Applications. *Nanoscale* **2019**, *11* (10), 4147–4182. <https://doi.org/10.1039/C9NR00218A>.
- (8) Li, C.; Li, Q.; Kaneti, Y. V.; Hou, D.; Yamauchi, Y.; Mai, Y. Self-Assembly of Block Copolymers towards Mesoporous Materials for Energy Storage and Conversion Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (14), 4681–4736. <https://doi.org/10.1039/D0CS00021C>.
- (9) Ling, S.; Chen, W.; Fan, Y.; Zheng, K.; Jin, K.; Yu, H.; Buehler, M. J.; Kaplan, D. L. Biopolymer Nanofibrils: Structure, Modeling, Preparation, and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2018**, *85*, 1–56. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.06.004>.
- (10) Lai, Y.; Li, F.; Zou, Z.; Saeed, M.; Xu, Z.; Yu, H. Bio-Inspired Amyloid Polypeptides: From Self-Assembly to Nanostructure Design and Biotechnological Applications. *Appl. Mater. Today* **2021**, *22*, 100966. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.100966>.
- (11) Kinser, E. R.; Padmanabhan, J.; Yu, R.; Corona, S. L.; Li, J.; Vaddiraju, S.; Legassey, A.; Loye, A.; Balestrini, J.; Solly, D. A.; Schroers, J.; Taylor, A. D.; Papadimitrakopoulos, F.; Herzog, R. I.; Kyriakides, T. R. Nanopatterned Bulk Metallic Glass Biosensors. *ACS Sens.* **2017**, *2* (12), 1779–1787. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00455>.
- (12) Executive Summary of IRDS 2020. Available: <https://lrds.ieee.org/Editions/2020>.

- (13) Cui, X.; Tawa, K.; Kintaka, K.; Nishii, J. Enhanced Fluorescence Microscopic Imaging by Plasmonic Nanostructures: From a 1D Grating to a 2D Nanohole Array. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20* (6), 945–950. <https://doi.org/10.1002/adfm.200901993>.
- (14) Lithography Section of IRDS 2020. Available: <https://lrds.leece.org/Editions/2020>.
- (15) Manouras, T.; Argitis, P. High Sensitivity Resists for EUV Lithography: A Review of Material Design Strategies and Performance Results. *Nanomaterials* **2020**, *10* (8), 1593. <https://doi.org/10.3390/nano10081593>.
- (16) Jung, W.; Jang, S.; Cho, S.; Jeon, H.; Jung, H. Recent Progress in Simple and Cost-Effective Top-Down Lithography for  $\approx 10$  Nm Scale Nanopatterns: From Edge Lithography to Secondary Sputtering Lithography. *Adv. Mater.* **2020**, *32* (35), 1907101. <https://doi.org/10.1002/adma.201907101>.
- (17) Lee, Y. S. *Self-Assembly and Nanotechnology*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470292525>.
- (18) Lombardo, D.; Kiselev, M. A.; Magazù, S.; Calandra, P. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches. *Adv. Condens. Matter Phys.* **2015**, *2015*, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2015/151683>.
- (19) Wang, L.; Gong, C.; Yuan, X.; Wei, G. Controlling the Self-Assembly of Biomolecules into Functional Nanomaterials through Internal Interactions and External Stimulations: A Review. *Nanomaterials* **2019**, *9* (2), 285. <https://doi.org/10.3390/nano9020285>.
- (20) Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (4), 1533–1554. <https://doi.org/10.1021/cr9502357>.
- (21) Schwartz, D. K. Mechanisms and Kinetics of Self-Assembled Monolayer Formation. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, *52* (1), 107–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.52.1.107>.
- (22) Liu, L.; Mei, A.; Liu, T.; Jiang, P.; Sheng, Y.; Zhang, L.; Han, H. Fully Printable Mesoscopic Perovskite Solar Cells with Organic Silane Self-Assembled Monolayer. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (5), 1790–1793. <https://doi.org/10.1021/ja5125594>.
- (23) Narayan, T.; Kumar, S.; Kumar, S.; Augustine, S.; Yadav, B. K.; Malhotra, B. D. Protein Functionalised Self Assembled Monolayer Based Biosensor for Colon Cancer Detection. *Talanta* **2019**, *201*, 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.039>.
- (24) Singh, T.; Sreenivasan, S. V.; Choi, J.; Schumaker, P.; Xu, F. Status of UV Imprint Lithography for Nanoscale Manufacturing. In *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*; Elsevier, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10251-6>.
- (25) Krishnamoorthy, M.; Hakobyan, S.; Ramstedt, M.; Gautrot, J. E. Surface-Initiated Polymer Brushes in the Biomedical Field: Applications in Membrane Science, Biosensing, Cell Culture, Regenerative Medicine and Antibacterial Coatings. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (21), 10976–11026. <https://doi.org/10.1021/cr500252u>.
- (26) Wang, Y.; Chen, K. S.; Mishler, J.; Cho, S. C.; Adroher, X. C. A Review of Polymer Electrolyte Membrane Fuel Cells: Technology, Applications, and Needs on Fundamental Research. *Appl. Energy* **2011**, *88* (4), 981–1007. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.09.030>.
- (27) Ayres, N. Polymer Brushes: Applications in Biomaterials and Nanotechnology. *Polym Chem* **2010**, *1* (6), 769–777. <https://doi.org/10.1039/B9PY00246D>.

- (28) Nemani, S. K.; Annavarapu, R. K.; Mohammadian, B.; Raiyan, A.; Heil, J.; Haque, Md. A.; Abdelaal, A.; Sojoudi, H. Surface Modification of Polymers: Methods and Applications. *Adv. Mater. Interfaces* **2018**, *5* (24), 1801247. <https://doi.org/10.1002/admi.201801247>.
- (29) Shoichet, M. S. Polymer Scaffolds for Biomaterials Applications. *Macromolecules* **2010**, *43* (2), 581–591. <https://doi.org/10.1021/ma901530r>.
- (30) Lazzari, M.; Torneiro, M. A Global View on Block Copolymers. *Polymers* **2020**, *12* (4), 869. <https://doi.org/10.3390/polym12040869>.
- (31) Samaddar, P.; Deep, A.; Kim, K.-H. An Engineering Insight into Block Copolymer Self-Assembly: Contemporary Application from Biomedical Research to Nanotechnology. *Chem. Eng. J.* **2018**, *342*, 71–89. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.062>.
- (32) Nisticò, R. Block Copolymers for Designing Nanostructured Porous Coatings. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2018**, *9*, 2332–2344. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.218>.
- (33) Konishcheva, E.; Daubian, D.; Gaitzsch, J.; Meier, W. Synthesis of Linear ABC Triblock Copolymers and Their Self-Assembly in Solution. *Helv. Chim. Acta* **2018**, *101* (2), e1700287. <https://doi.org/10.1002/hlca.201700287>.
- (34) Matyjaszewski, K.; Spanswick, J. Controlled/Living Radical Polymerization. *Mater. Today* **2005**, *8* (3), 26–33. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(05\)00745-5](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(05)00745-5).
- (35) Matyjaszewski, K. Advanced Materials by Atom Transfer Radical Polymerization. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (23), 1706441. <https://doi.org/10.1002/adma.201706441>.
- (36) Sun, J.-T.; Hong, C.-Y.; Pan, C.-Y. Recent Advances in RAFT Dispersion Polymerization for Preparation of Block Copolymer Aggregates. *Polym Chem* **2013**, *4* (4), 873–881. <https://doi.org/10.1039/C2PY20612A>.
- (37) Matsuo, Y.; Konno, R.; Ishizone, T.; Goseki, R.; Hirao, A. Precise Synthesis of Block Polymers Composed of Three or More Blocks by Specially Designed Linking Methodologies in Conjunction with Living Anionic Polymerization System. *Polymers* **2013**, *5* (3), 1012–1040. <https://doi.org/10.3390/polym5031012>.
- (38) Seshimo, T.; Maeda, R.; Odashima, R.; Takenaka, Y.; Kawana, D.; Ohmori, K.; Hayakawa, T. Perpendicularly Oriented Sub-10-Nm Block Copolymer Lamellae by Atmospheric Thermal Annealing for One Minute. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1). <https://doi.org/10.1038/srep19481>.
- (39) Isono, T.; Ree, B. J.; Tajima, K.; Borsali, R.; Satoh, T. Highly Ordered Cylinder Morphologies with 10 Nm Scale Periodicity in Biomass-Based Block Copolymers. *Macromolecules* **2018**, *51* (2), 428–437. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b02279>.
- (40) Cochran, E. W.; Garcia-Cervera, C. J.; Fredrickson, G. H. Stability of the Gyroid Phase in Diblock Copolymers at Strong Segregation. *Macromolecules* **2006**, *39* (7), 2449–2451. <https://doi.org/10.1021/ma0527707>.
- (41) Ham, S.; Shin, C.; Kim, E.; Ryu, D. Y.; Jeong, U.; Russell, T. P.; Hawker, C. J. Microdomain Orientation of PS-*b*-PMMA by Controlled Interfacial Interactions. *Macromolecules* **2008**, *41* (17), 6431–6437. <https://doi.org/10.1021/ma8007338>.
- (42) Bates, F. S.; Fredrickson, G. H. Block Copolymers—Designer Soft Materials. *Phys. Today* **1999**, *52* (2), 32–38. <https://doi.org/10.1063/1.882522>.

- (43) Johnston, D. E. Plasma Etch Transfer of Self-Assembled Polymer Patterns. *J. MicroNanolithography MEMS MOEMS* **2012**, *11* (3), 031306. <https://doi.org/10.1117/1.JMM.11.3.031306>.
- (44) Ouk Kim, S.; Solak, H. H.; Stoykovich, M. P.; Ferrier, N. J.; de Pablo, J. J.; Nealey, P. F. Epitaxial Self-Assembly of Block Copolymers on Lithographically Defined Nanopatterned Substrates. *Nature* **2003**, *424* (6947), 411–414. <https://doi.org/10.1038/nature01775>.
- (45) Ruiz, R.; Kang, H.; Detcheverry, F. A.; Dobisz, E.; Kercher, D. S.; Albrecht, T. R.; de Pablo, J. J.; Nealey, P. F. Density Multiplication and Improved Lithography by Directed Block Copolymer Assembly. *Science* **2008**, *321* (5891), 936–939. <https://doi.org/10.1126/science.1157626>.
- (46) Bai, W.; Hannon, A. F.; Gotrik, K. W.; Choi, H. K.; Aissou, K.; Lontos, G.; Ntetsikas, K.; Alexander-Katz, A.; Avgeropoulos, A.; Ross, C. A. Thin Film Morphologies of Bulk-Gyroid Polystyrene-Block-Polydimethylsiloxane under Solvent Vapor Annealing. *Macromolecules* **2014**, *47* (17), 6000–6008. <https://doi.org/10.1021/ma501293n>.
- (47) Leibler, L. Theory of Microphase Separation in Block Copolymers. *Macromolecules* **1980**, *13* (6), 1602–1617. <https://doi.org/10.1021/ma60078a047>.
- (48) Albert, J. N. L.; Epps, T. H. Self-Assembly of Block Copolymer Thin Films. *Mater. Today* **2010**, *13* (6), 24–33. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(10\)70106-1](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(10)70106-1).
- (49) Wang, H. S.; Kim, K. H.; Bang, J. Thermal Approaches to Perpendicular Block Copolymer Microdomains in Thin Films: A Review and Appraisal. *Macromol. Rapid Commun.* **2019**, *40* (4), 1800728. <https://doi.org/10.1002/marc.201800728>.
- (50) Sinturel, C.; Vayer, M.; Morris, M.; Hillmyer, M. A. Solvent Vapor Annealing of Block Polymer Thin Films. *Macromolecules* **2013**, *46* (14), 5399–5415. <https://doi.org/10.1021/ma400735a>.
- (51) Abetz, V.; Goldacker, T. Formation of Superlattices via Blending of Block Copolymers. *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21* (1), 16–34. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3927\(20000101\)21:1<16::AID-MARC16>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3927(20000101)21:1<16::AID-MARC16>3.0.CO;2-S).
- (52) Son, J. G.; Chang, J.-B.; Berggren, K. K.; Ross, C. A. Assembly of Sub-10-Nm Block Copolymer Patterns with Mixed Morphology and Period Using Electron Irradiation and Solvent Annealing. *Nano Lett.* **2011**, *11* (11), 5079–5084. <https://doi.org/10.1021/nl203445h>.
- (53) Li, Y.; Xu, Y.; Cao, S.; Zhao, Y.; Qu, T.; Iyoda, T.; Chen, A. Nanoporous Films with Sub-10 Nm in Pore Size from Acid-Cleavable Block Copolymers. *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38* (5), 1600662. <https://doi.org/10.1002/marc.201600662>.
- (54) Nagpal, U.; Müller, M.; Nealey, P. F.; de Pablo, J. J. Free Energy of Defects in Ordered Assemblies of Block Copolymer Domains. *ACS Macro Lett.* **2012**, *1* (3), 418–422. <https://doi.org/10.1021/mz200245s>.
- (55) Li, W.; Müller, M. Defects in the Self-Assembly of Block Copolymers and Their Relevance for Directed Self-Assembly. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2015**, *6* (1), 187–216. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061114-123209>.

- (56) Leniart, A. A.; Pula, P.; Sitkiewicz, A.; Majewski, P. W. Macroscopic Alignment of Block Copolymers on Silicon Substrates by Laser Annealing. *ACS Nano* **2020**, *14* (4), 4805–4815. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c00696>.
- (57) Jin, H. M.; Park, D. Y.; Jeong, S.-J.; Lee, G. Y.; Kim, J. Y.; Mun, J. H.; Cha, S. K.; Lim, J.; Kim, J. S.; Kim, K. H.; Lee, K. J.; Kim, S. O. Flash Light Millisecond Self-Assembly of High  $\chi$  Block Copolymers for Wafer-Scale Sub-10 Nm Nanopatterning. *Adv. Mater.* **2017**, *29* (32), 1700595. <https://doi.org/10.1002/adma.201700595>.
- (58) Lee, J. H.; Kim, Y.; Cho, J.-Y.; Yang, S. R.; Kim, J. M.; Yim, S.; Lee, H.; Jung, Y. S. In Situ Nanolithography with Sub-10 Nm Resolution Realized by Thermally Assisted Spin-Casting of a Self-Assembling Polymer. *Adv. Mater.* **2015**, *27* (33), 4814–4822. <https://doi.org/10.1002/adma.201501363>.
- (59) Nieto Simavilla, D.; Huang, W.; Housmans, C.; Sferrazza, M.; Napolitano, S. Taming the Strength of Interfacial Interactions via Nanoconfinement. *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4* (6), 755–759. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00240>.
- (60) Panagopoulou, A.; Napolitano, S. Irreversible Adsorption Governs the Equilibration of Thin Polymer Films. *Phys. Rev. Lett.* **2017**, *119* (9). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.119.097801>.
- (61) Kim, D. H.; Kim, S. Y. Self-Assembled Copolymer Adsorption Layer-Induced Block Copolymer Nanostructures in Thin Films. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5* (9), 1562–1571. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00560>.
- (62) Park, S.-M.; Craig, G. S. W.; Liu, C.-C.; La, Y.-H.; Ferrier, N. J.; Nealey, P. F. Characterization of Cylinder-Forming Block Copolymers Directed to Assemble on Spotted Chemical Patterns. *Macromolecules* **2008**, *41* (23), 9118–9123. <https://doi.org/10.1021/ma8009917>.
- (63) Gottlieb, S.; Rösner, B.; Evangelio, L.; Fernández-Regúlez, M.; Nogales, A.; García-Gutiérrez, M. C.; Keller, T. F.; Fraxedas, J.; Ezquerro, T. A.; David, C.; Perez-Murano, F. Self-Assembly Morphology of Block Copolymers in Sub-10 Nm Topographical Guiding Patterns. *Mol. Syst. Des. Eng.* **2019**, *4* (1), 175–185. <https://doi.org/10.1039/C8ME00046H>.
- (64) Segal-Peretz, T.; Ren, J.; Xiong, S.; Khaira, G.; Bowen, A.; Ocola, L. E.; Divan, R.; Doxastakis, M.; Ferrier, N. J.; de Pablo, J.; Nealey, P. F. Quantitative Three-Dimensional Characterization of Block Copolymer Directed Self-Assembly on Combined Chemical and Topographical Prepatterned Templates. *ACS Nano* **2017**, *11* (2), 1307–1319. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b05657>.
- (65) Yi, H.; Bao, X.-Y.; Tiberio, R.; Wong, H.-S. P. A General Design Strategy for Block Copolymer Directed Self-Assembly Patterning of Integrated Circuits Contact Holes Using an Alphabet Approach. *Nano Lett.* **2015**, *15* (2), 805–812. <https://doi.org/10.1021/nl502172m>.
- (66) Cushen, J.; Wan, L.; Blachut, G.; Maher, M. J.; Albrecht, T. R.; Ellison, C. J.; Willson, C. G.; Ruiz, R. Double-Patterned Sidewall Directed Self-Assembly and Pattern Transfer of Sub-10 Nm PTMSS- *b* -PMOST. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (24), 13476–13483. <https://doi.org/10.1021/acсами.5b02481>.

- (67) Do, H. W.; Choi, H. K.; Gadelrab, K. R.; Chang, J.-B.; Alexander-Katz, A.; Ross, C. A.; Berggren, K. K. Directed Self-Assembly of a Two-State Block Copolymer System. *Nano Converg.* **2018**, *5* (1). <https://doi.org/10.1186/s40580-018-0156-z>.
- (68) Park, S.-M.; Liang, X.; Harteneck, B. D.; Pick, T. E.; Hiroshiba, N.; Wu, Y.; Helms, B. A.; Olynick, D. L. Sub-10 Nm Nanofabrication *via* Nanoimprint Directed Self-Assembly of Block Copolymers. *ACS Nano* **2011**, *5* (11), 8523–8531. <https://doi.org/10.1021/nn201391d>.
- (69) Otsuka, I.; Nilsson, N.; Suyatin, D. B.; Maximov, I.; Borsali, R. Carbohydrate-Based Block Copolymer Systems: Directed Self-Assembly for Nanolithography Applications. *Soft Matter* **2017**, *13* (40), 7406–7411. <https://doi.org/10.1039/C7SM01429E>.
- (70) Yang, X.; Xiao, S.; Hu, W.; Hwu, J.; van de Veerdonk, R.; Wago, K.; Lee, K.; Kuo, D. Integration of Nanoimprint Lithography with Block Copolymer Directed Self-Assembly for Fabrication of a Sub-20 Nm Template for Bit-Patterned Media. *Nanotechnology* **2014**, *25* (39), 395301. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/39/395301>.
- (71) Lane, A. P.; Yang, X.; Maher, M. J.; Blachut, G.; Asano, Y.; Someya, Y.; Mallavarapu, A.; Sirard, S. M.; Ellison, C. J.; Willson, C. G. Directed Self-Assembly and Pattern Transfer of Five Nanometer Block Copolymer Lamellae. *ACS Nano* **2017**, *11* (8), 7656–7665. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b02698>.
- (72) Crossland, E. J. W.; Nedelcu, M.; Ducati, C.; Ludwigs, S.; Hillmyer, M. A.; Steiner, U.; Snaith, H. J. Block Copolymer Morphologies in Dye-Sensitized Solar Cells: Probing the Photovoltaic Structure–Function Relation. *Nano Lett.* **2009**, *9* (8), 2813–2819. <https://doi.org/10.1021/nl800942c>.
- (73) Majewski, P. W.; Gopinadhan, M.; Osuji, C. O. Magnetic Field Alignment of Block Copolymers and Polymer Nanocomposites: Scalable Microstructure Control in Functional Soft Materials. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2012**, *50* (1), 2–8. <https://doi.org/10.1002/polb.22382>.
- (74) Liedel, C.; Pester, C. W.; Ruppel, M.; Urban, V. S.; Böker, A. Beyond Orientation: The Impact of Electric Fields on Block Copolymers. *Macromol. Chem. Phys.* **2012**, *213* (3), 259–269. <https://doi.org/10.1002/macp.201100590>.
- (75) Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (1), 301–312. <https://doi.org/10.1039/B918763B>.
- (76) Ifuku, S. Chitin and Chitosan Nanofibers: Preparation and Chemical Modifications. *Molecules* **2014**, *19* (11), 18367–18380. <https://doi.org/10.3390/molecules191118367>.
- (77) Zhu, H.; Luo, W.; Ciesielski, P. N.; Fang, Z.; Zhu, J. Y.; Henriksson, G.; Himmel, M. E.; Hu, L. Wood-Derived Materials for Green Electronics, Biological Devices, and Energy Applications. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (16), 9305–9374. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00225>.
- (78) Isogai, A.; Zhou, Y. Diverse Nanocelluloses Prepared from TEMPO-Oxidized Wood Cellulose Fibers: Nanonetworks, Nanofibers, and Nanocrystals. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2019**, *23* (2), 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2019.01.001>.

- (79) Liu, W.; Du, H.; Zhang, M.; Liu, K.; Liu, H.; Xie, H.; Zhang, X.; Si, C. Bacterial Cellulose-Based Composite Scaffolds for Biomedical Applications: A Review. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8* (20), 7536–7562. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00125>.
- (80) Parker, R. M.; Guidetti, G.; Williams, C. A.; Zhao, T.; Narkevicius, A.; Vignolini, S.; Frka-Petescic, B. The Self-Assembly of Cellulose Nanocrystals: Hierarchical Design of Visual Appearance. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (19), 1704477. <https://doi.org/10.1002/adma.201704477>.
- (81) Isogai, A. Structural Characterization and Modifications of Surface-Oxidized Cellulose Nanofiber. *J. Jpn. Pet. Inst.* **2015**, *58* (6), 365–375. <https://doi.org/10.1627/jpi.58.365>.
- (82) Flauzino Neto, W. P.; Putaux, J.-L.; Mariano, M.; Ogawa, Y.; Otaguro, H.; Pasquini, D.; Dufresne, A. Comprehensive Morphological and Structural Investigation of Cellulose I and II Nanocrystals Prepared by Sulphuric Acid Hydrolysis. *RSC Adv.* **2016**, *6* (79), 76017–76027. <https://doi.org/10.1039/C6RA16295A>.
- (83) Lagerwall, J. P. F.; Schütz, C.; Salajkova, M.; Noh, J.; Hyun Park, J.; Scalia, G.; Bergström, L. Cellulose Nanocrystal-Based Materials: From Liquid Crystal Self-Assembly and Glass Formation to Multifunctional Thin Films. *NPG Asia Mater.* **2014**, *6* (1), e80–e80. <https://doi.org/10.1038/am.2013.69>.
- (84) Sabo, R.; Yermakov, A.; Law, C. T.; Elhajjar, R. Nanocellulose-Enabled Electronics, Energy Harvesting Devices, Smart Materials and Sensors: A Review. *J. Renew. Mater.* **2016**, *4* (5), 297–312. <https://doi.org/10.7569/JRM.2016.634114>.
- (85) Moon, R. J.; Martini, A.; Nairn, J.; Simonsen, J.; Youngblood, J. Cellulose Nanomaterials Review: Structure, Properties and Nanocomposites. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (7), 3941. <https://doi.org/10.1039/c0cs00108b>.
- (86) Saito, T.; Nishiyama, Y.; Putaux, J.-L.; Vignon, M.; Isogai, A. Homogeneous Suspensions of Individualized Microfibrils from TEMPO-Catalyzed Oxidation of Native Cellulose. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (6), 1687–1691. <https://doi.org/10.1021/bm060154s>.
- (87) Siró, I.; Plackett, D. Microfibrillated Cellulose and New Nanocomposite Materials: A Review. *Cellulose* **2010**, *17* (3), 459–494. <https://doi.org/10.1007/s10570-010-9405-y>.
- (88) Araki, J.; Wada, M.; Kuga, S. Steric Stabilization of a Cellulose Microcrystal Suspension by Poly(Ethylene Glycol) Grafting. *Langmuir* **2001**, *17* (1), 21–27. <https://doi.org/10.1021/la001070m>.
- (89) Song, W.; Lee, J.-K.; Gong, M. S.; Heo, K.; Chung, W.-J.; Lee, B. Y. Cellulose Nanocrystal-Based Colored Thin Films for Colorimetric Detection of Aldehyde Gases. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (12), 10353–10361. <https://doi.org/10.1021/acsmi.7b19738>.
- (90) Habibi, Y.; Heim, T.; Douillard, R. AC Electric Field-Assisted Assembly and Alignment of Cellulose Nanocrystals. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2008**, *46* (14), 1430–1436. <https://doi.org/10.1002/polb.21479>.
- (91) Habibi, Y.; Lucia, L. A.; Rojas, O. J. Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (6), 3479–3500. <https://doi.org/10.1021/cr900339w>.
- (92) Bordel, D.; Putaux, J.-L.; Heux, L. Orientation of Native Cellulose in an Electric Field. *Langmuir* **2006**, *22* (11), 4899–4901. <https://doi.org/10.1021/la0600402>.

- (93) Yuan, Z.; Zhang, J.; Jiang, A.; Lv, W.; Wang, Y.; Geng, H.; Wang, J.; Qin, M. Fabrication of Cellulose Self-Assemblies and High-Strength Ordered Cellulose Films. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *117*, 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.003>.
- (94) Zhu, K. Y.; Merzendorfer, H.; Zhang, W.; Zhang, J.; Muthukrishnan, S. Biosynthesis, Turnover, and Functions of Chitin in Insects. *Annu. Rev. Entomol.* **2016**, *61* (1), 177–196. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023933>.
- (95) Younes, I.; Rinaudo, M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar. Drugs* **2015**, *13* (3), 1133–1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>.
- (96) Ghormade, V.; Pathan, E. K.; Deshpande, M. V. Can Fungi Compete with Marine Sources for Chitosan Production? *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 1415–1421. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112>.
- (97) Pillai, C. K. S.; Paul, W.; Sharma, C. P. Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, Solubility and Fiber Formation. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34* (7), 641–678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>.
- (98) Goodrich, J. D.; Winter, W. T.  $\alpha$ -Chitin Nanocrystals Prepared from Shrimp Shells and Their Specific Surface Area Measurement. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (1), 252–257. <https://doi.org/10.1021/bm0603589>.
- (99) Fan, Y.; Saito, T.; Isogai, A. Chitin Nanocrystals Prepared by TEMPO-Mediated Oxidation of  $\alpha$ -Chitin. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (1), 192–198. <https://doi.org/10.1021/bm700966g>.
- (100) Ding, F.; Deng, H.; Du, Y.; Shi, X.; Wang, Q. Emerging Chitin and Chitosan Nanofibrous Materials for Biomedical Applications. *Nanoscale* **2014**, *6* (16), 9477–9493. <https://doi.org/10.1039/C4NR02814G>.
- (101) Salaberria, A. M.; Labidi, J.; Fernandes, S. C. M. Different Routes to Turn Chitin into Stunning Nano-Objects. *Eur. Polym. J.* **2015**, *68*, 503–515. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.03.005>.
- (102) Zeng, J.-B.; He, Y.-S.; Li, S.-L.; Wang, Y.-Z. Chitin Whiskers: An Overview. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1021/bm201564a>.
- (103) Narkevicius, A.; Steiner, L. M.; Parker, R. M.; Ogawa, Y.; Frka-Petecic, B.; Vignolini, S. Controlling the Self-Assembly Behavior of Aqueous Chitin Nanocrystal Suspensions. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (7), 2830–2838. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00589>.
- (104) Qasim, S.; Zafar, M.; Najeeb, S.; Khurshid, Z.; Shah, A.; Husain, S.; Rehman, I. Electrospinning of Chitosan-Based Solutions for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (2), 407. <https://doi.org/10.3390/ijms19020407>.
- (105) Fan, Y.; Fukuzumi, H.; Saito, T.; Isogai, A. Comparative Characterization of Aqueous Dispersions and Cast Films of Different Chitin Nanowhiskers/Nanofibers. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50* (1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.09.026>.
- (106) Wu, Q.; Jungstedt, E.; Šoltésová, M.; Mushi, N. E.; Berglund, L. A. High Strength Nanostructured Films Based on Well-Preserved  $\beta$ -Chitin Nanofibrils. *Nanoscale* **2019**, *11* (22), 11001–11011. <https://doi.org/10.1039/C9NR02870F>.

- (107) Fan, Y.; Saito, T.; Isogai, A. Chitin Nanocrystals Prepared by TEMPO-Mediated Oxidation of  $\alpha$ -Chitin. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (1), 192–198. <https://doi.org/10.1021/bm700966g>.
- (108) Rinaudo, M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31* (7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.
- (109) Wang, Z.; Fei, S.; Kong, W.; Xiao, Q.; Zhu, J. Effects of Metal Ions on the Self-Assembly of Chitosan Molecules Investigated with Atomic Force Microscopy. *Int. J. Food Prop.* **2018**, *21* (1), 1986–1994. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1497062>.
- (110) You, J.; Li, M.; Ding, B.; Wu, X.; Li, C. Crab Chitin-Based 2D Soft Nanomaterials for Fully Biobased Electric Devices. *Adv. Mater.* **2017**, *29* (19), 1606895. <https://doi.org/10.1002/adma.201606895>.
- (111) Wang, H.; Qian, J.; Ding, F. Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (2), 395–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04528>.
- (112) Manabe, K. Growth of Porous Chitin-Nanofibrous Structure via Layer-by-Layer Self-Assembly under Existing Ionic Effects for Antireflective and Antifogging Coatings. *Prog. Org. Coat.* **2020**, *142*, 105599. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.105599>.
- (113) Nogueira, G. M.; Swiston, A. J.; Beppu, M. M.; Rubner, M. F. Layer-by-Layer Deposited Chitosan/Silk Fibroin Thin Films with Anisotropic Nanofiber Alignment. *Langmuir* **2010**, *26* (11), 8953–8958. <https://doi.org/10.1021/la904741h>.
- (114) Carloni, L.; Bezzu, C. G.; Bonifazi, D. Patterning Porous Networks through Self-Assembly of Programmed Biomacromolecules. *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25* (71), 16179–16200. <https://doi.org/10.1002/chem.201902576>.
- (115) Nummelin, S.; Kommeri, J.; Kostianen, M. A.; Linko, V. Evolution of Structural DNA Nanotechnology. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (24), 1703721. <https://doi.org/10.1002/adma.201703721>.
- (116) Watson, J. D.; Crick, J. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 171st ed. 1953, pp 737–738.
- (117) Rothmund, P. W. K. Folding DNA to Create Nanoscale Shapes and Patterns. *Nature* **2006**, *440* (7082), 297–302. <https://doi.org/10.1038/nature04586>.
- (118) Halley, P. D.; Patton, R. A.; Chowdhury, A.; Byrd, J. C.; Castro, C. E. Low-Cost, Simple, and Scalable Self-Assembly of DNA Origami Nanostructures. *Nano Res.* **2019**, *12* (5), 1207–1215. <https://doi.org/10.1007/s12274-019-2384-x>.
- (119) Pound, E.; Ashton, J. R.; Becerril, H. A.; Woolley, A. T. Polymerase Chain Reaction Based Scaffold Preparation for the Production of Thin, Branched DNA Origami Nanostructures of Arbitrary Sizes. *Nano Lett.* **2009**, *9* (12), 4302–4305. <https://doi.org/10.1021/nl902535q>.
- (120) Seeman, N. C.; Belcher, A. M. Emulating Biology: Building Nanostructures from the Bottom-up. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (Supplement 2), 6451–6455. <https://doi.org/10.1073/pnas.221458298>.
- (121) Nayak, A. K.; Rath, S. K.; Subudhi, U. Preparation of Stable Branched DNA Nanostructures: Process of Cooperative Self-Assembly. *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123* (17), 3591–3597. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b00353>.

- (122) Winfree, E.; Liu, F.; Wenzler, L. A.; Seeman, N. C. Design and Self-Assembly of Two-Dimensional DNA Crystals. *Nature* **1998**, *394* (6693), 539–544. <https://doi.org/10.1038/28998>.
- (123) Wei, B.; Dai, M.; Yin, P. Complex Shapes Self-Assembled from Single-Stranded DNA Tiles. *Nature* **2012**, *485* (7400), 623–626. <https://doi.org/10.1038/nature11075>.
- (124) Singh, T.; Sreenivasan, S. V.; Choi, J.; Schumaker, P.; Xu, F. Status of UV Imprint Lithography for Nanoscale Manufacturing. In *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*; Elsevier, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10251-6>.
- (125) Li, Z.; Wang, J.; Li, Y.; Liu, X.; Yuan, Q. Self-Assembled DNA Nanomaterials with Highly Programmed Structures and Functions. *Mater. Chem. Front.* **2018**, *2* (3), 423–436. <https://doi.org/10.1039/C7QM00434F>.
- (126) Zhao, Z.; Liu, Y.; Yan, H. Organizing DNA Origami Tiles into Larger Structures Using Preformed Scaffold Frames. *Nano Lett.* **2011**, *11* (7), 2997–3002. <https://doi.org/10.1021/nl201603a>.
- (127) Wang, P.; Gaitanaros, S.; Lee, S.; Bathe, M.; Shih, W. M.; Ke, Y. Programming Self-Assembly of DNA Origami Honeycomb Two-Dimensional Lattices and Plasmonic Metamaterials. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (24), 7733–7740. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b03966>.
- (128) Woo, S.; Rothmund, P. W. K. Programmable Molecular Recognition Based on the Geometry of DNA Nanostructures. *Nat. Chem.* **2011**, *3* (8), 620–627. <https://doi.org/10.1038/nchem.1070>.
- (129) Rajendran, A.; Endo, M.; Katsuda, Y.; Hidaka, K.; Sugiyama, H. Programmed Two-Dimensional Self-Assembly of Multiple DNA Origami Jigsaw Pieces. *ACS Nano* **2011**, *5* (1), 665–671. <https://doi.org/10.1021/nn1031627>.
- (130) Tikhomirov, G.; Petersen, P.; Qian, L. Fractal Assembly of Micrometre-Scale DNA Origami Arrays with Arbitrary Patterns. *Nature* **2017**, *552* (7683), 67–71. <https://doi.org/10.1038/nature24655>.
- (131) Aghebat Rafat, A.; Pirzer, T.; Scheible, M. B.; Kostina, A.; Simmel, F. C. Surface-Assisted Large-Scale Ordering of DNA Origami Tiles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (29), 7665–7668. <https://doi.org/10.1002/anie.201403965>.
- (132) Suzuki, Y.; Sugiyama, H.; Endo, M. Complexing DNA Origami Frameworks through Sequential Self-Assembly Based on Directed Docking. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (24), 7061–7065. <https://doi.org/10.1002/anie.201801983>.
- (133) Malo, J.; Mitchell, J. C.; Vénien-Bryan, C.; Harris, J. R.; Wille, H.; Sherratt, D. J.; Turberfield, A. J. Engineering a 2D Protein-DNA Crystal. *Angew. Chem.* **2005**, *117* (20), 3117–3121. <https://doi.org/10.1002/ange.200463027>.
- (134) Yan, H. DNA-Templated Self-Assembly of Protein Arrays and Highly Conductive Nanowires. *Science* **2003**, *301* (5641), 1882–1884. <https://doi.org/10.1126/science.1089389>.
- (135) Hamada, S.; Murata, S. Substrate-Assisted Assembly of Interconnected Single-Duplex DNA Nanostructures. *Angew. Chem.* **2009**, *121* (37), 6952–6955. <https://doi.org/10.1002/ange.200902662>.

- (136) He, Y.; Tian, Y.; Chen, Y.; Deng, Z.; Ribbe, A. E.; Mao, C. Sequence Symmetry as a Tool for Designing DNA Nanostructures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (41), 6694–6696. <https://doi.org/10.1002/anie.200502193>.
- (137) Tian, C.; Zhang, C.; Li, X.; Hao, C.; Ye, S.; Mao, C. Approaching the Limit: Can One DNA Strand Assemble into Defined Nanostructures? *Langmuir* **2014**, *30* (20), 5859–5862. <https://doi.org/10.1021/la402326b>.
- (138) Zhang, F.; Liu, Y.; Yan, H. Complex Archimedean Tiling Self-Assembled from DNA Nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (20), 7458–7461. <https://doi.org/10.1021/ja4035957>.
- (139) Douglas, S. M.; Dietz, H.; Liedl, T.; Högberg, B.; Graf, F.; Shih, W. M. Self-Assembly of DNA into Nanoscale Three-Dimensional Shapes. *Nature* **2009**, *459* (7245), 414–418. <https://doi.org/10.1038/nature08016>.
- (140) Ke, Y.; Sharma, J.; Liu, M.; Jahn, K.; Liu, Y.; Yan, H. Scaffolded DNA Origami of a DNA Tetrahedron Molecular Container. *Nano Lett.* **2009**, *9* (6), 2445–2447. <https://doi.org/10.1021/nl901165f>.
- (141) Hamblin, G. D.; Rahbani, J. F.; Sleiman, H. F. Sequential Growth of Long DNA Strands with User-Defined Patterns for Nanostructures and Scaffolds. *Nat. Commun.* **2015**, *6* (1). <https://doi.org/10.1038/ncomms8065>.
- (142) Benson, E.; Mohammed, A.; Gardell, J.; Masich, S.; Czeizler, E.; Orponen, P.; Högberg, B. DNA Rendering of Polyhedral Meshes at the Nanoscale. *Nature* **2015**, *523* (7561), 441–444. <https://doi.org/10.1038/nature14586>.
- (143) Lei, D.; Marras, A. E.; Liu, J.; Huang, C.-M.; Zhou, L.; Castro, C. E.; Su, H.-J.; Ren, G. Three-Dimensional Structural Dynamics of DNA Origami Bennett Linkages Using Individual-Particle Electron Tomography. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03018-0>.
- (144) Marras, A. E.; Zhou, L.; Su, H.-J.; Castro, C. E. Programmable Motion of DNA Origami Mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (3), 713–718. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408869112>.
- (145) Du, M.; Zhou, K.; Wang, X.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Dong, J.; Wu, L.; Qiao, Z.; Chen, G.; Wang, Q. Precise Fabrication of De Novo Nanoparticle Lattices on Dynamic 2D Protein Crystalline Lattices. *Nano Lett.* **2020**, *20* (2), 1154–1160. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b04574>.
- (146) Tam, D. Y.; Zhuang, X.; Wong, S. W.; Lo, P. K. Photoresponsive Self-Assembled DNA Nanomaterials: Design, Working Principles, and Applications. *Small* **2019**, *15* (26), 1805481. <https://doi.org/10.1002/sml.201805481>.
- (147) Liu, M.; Fang, X.; Yang, Y.; Wang, C. Peptide-Enabled Targeted Delivery Systems for Therapeutic Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 701504. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.701504>.
- (148) Lai, Y.; Li, F.; Zou, Z.; Saeed, M.; Xu, Z.; Yu, H. Bio-Inspired Amyloid Polypeptides: From Self-Assembly to Nanostructure Design and Biotechnological Applications. *Appl. Mater. Today* **2021**, *22*, 100966. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.100966>.

- (149) Liu, L.; Klausen, L. H.; Dong, M. Two-Dimensional Peptide Based Functional Nanomaterials. *Nano Today* **2018**, *23*, 40–58. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2018.10.008>.
- (150) Ma, X.; Liu, L.; Mao, X.; Niu, L.; Deng, K.; Wu, W.; Li, Y.; Yang, Y.; Wang, C. Amyloid  $\beta$  (1–42) Folding Multiplicity and Single-Molecule Binding Behavior Studied with STM. *J. Mol. Biol.* **2009**, *388* (4), 894–901. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.054>.
- (151) Selivanova, O. M.; Surin, A. K.; Ryzhykau, Y. L.; Glyakina, A. V.; Suvorina, M. Yu.; Kuklin, A. I.; Rogachevsky, V. V.; Galzitskaya, O. V. To Be Fibrils or To Be Nanofilms? Oligomers Are Building Blocks for Fibril and Nanofilm Formation of Fragments of A $\beta$  Peptide. *Langmuir* **2018**, *34* (6), 2332–2343. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b03393>.
- (152) Jiang, T.; Xu, C.; Liu, Y.; Liu, Z.; Wall, J. S.; Zuo, X.; Lian, T.; Salaita, K.; Ni, C.; Pochan, D.; Conticello, V. P. Structurally Defined Nanoscale Sheets from Self-Assembly of Collagen-Mimetic Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (11), 4300–4308. <https://doi.org/10.1021/ja412867z>.
- (153) Dai, B.; Li, D.; Xi, W.; Luo, F.; Zhang, X.; Zou, M.; Cao, M.; Hu, J.; Wang, W.; Wei, G.; Zhang, Y.; Liu, C. Tunable Assembly of Amyloid-Forming Peptides into Nanosheets as a Retrovirus Carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (10), 2996–3001. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416690112>.
- (154) Erdoğan, H. Cation-Based Approach to Morphological Diversity of Diphenylalanine Dipeptide Structures. *Soft Matter* **2021**, *17* (20), 5221–5230. <https://doi.org/10.1039/D1SM00083G>.
- (155) Xu, Y.; Kirchner, M. Collagen Mimetic Peptides. *Bioengineering* **2021**, *8* (1), 5. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8010005>.
- (156) Merg, A. D.; Touponse, G.; van Genderen, E.; Zuo, X.; Bazrafshan, A.; Blum, T.; Hughes, S.; Salaita, K.; Abrahams, J. P.; Conticello, V. P. 2D Crystal Engineering of Nanosheets Assembled from Helical Peptide Building Blocks. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (38), 13507–13512. <https://doi.org/10.1002/anie.201906214>.
- (157) Jiang, T.; Xu, C.; Zuo, X.; Conticello, V. P. Structurally Homogeneous Nanosheets from Self-Assembly of a Collagen-Mimetic Peptide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (32), 8367–8371. <https://doi.org/10.1002/anie.201403780>.
- (158) Insua, I.; Montenegro, J. 1D to 2D Self Assembly of Cyclic Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (1), 300–307. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b10582>.
- (159) Nam, K. T.; Shelby, S. A.; Choi, P. H.; Marciel, A. B.; Chen, R.; Tan, L.; Chu, T. K.; Mesch, R. A.; Lee, B.-C.; Connolly, M. D.; Kisielowski, C.; Zuckermann, R. N. Free-Floating Ultrathin Two-Dimensional Crystals from Sequence-Specific Peptoid Polymers. *Nat. Mater.* **2010**, *9* (5), 454–460. <https://doi.org/10.1038/nmat2742>.
- (160) Sanii, B.; Kudirka, R.; Cho, A.; Venkateswaran, N.; Olivier, G. K.; Olson, A. M.; Tran, H.; Harada, R. M.; Tan, L.; Zuckermann, R. N. Shaken, Not Stirred: Collapsing a Peptoid Monolayer To Produce Free-Floating, Stable Nanosheets. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (51), 20808–20815. <https://doi.org/10.1021/ja206199d>.

- (161) Mannige, R. V.; Haxton, T. K.; Proulx, C.; Robertson, E. J.; Battigelli, A.; Butterfoss, G. L.; Zuckermann, R. N.; Whitelam, S. Peptoid Nanosheets Exhibit a New Secondary-Structure Motif. *Nature* **2015**, *526* (7573), 415–420. <https://doi.org/10.1038/nature15363>.
- (162) Erdogan, H.; Babur, E.; Yilmaz, M.; Candas, E.; Gordesel, M.; Dede, Y.; Oren, E. E.; Demirel, G. B.; Ozturk, M. K.; Yavuz, M. S.; Demirel, G. Morphological Versatility in the Self-Assembly of Val-Ala and Ala-Val Dipeptides. *Langmuir* **2015**, *31* (26), 7337–7345. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01406>.
- (163) Bera, S.; Arad, E.; Schnaider, L.; Shaham-Niv, S.; Castelletto, V.; Peretz, Y.; Zaguri, D.; Jelinek, R.; Gazit, E.; Hamley, I. W. Unravelling the Role of Amino Acid Sequence Order in the Assembly and Function of the Amyloid- $\beta$  Core. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (59), 8595–8598. <https://doi.org/10.1039/C9CC03654G>.
- (164) Abb, S.; Harnau, L.; Gutzler, R.; Rauschenbach, S.; Kern, K. Two-Dimensional Honeycomb Network through Sequence-Controlled Self-Assembly of Oligopeptides. *Nat. Commun.* **2016**, *7* (1), 10335. <https://doi.org/10.1038/ncomms10335>.
- (165) Lewandowska, U.; Zajaczkowski, W.; Corra, S.; Tanabe, J.; Borrmann, R.; Benetti, E. M.; Stappert, S.; Watanabe, K.; Ochs, N. A. K.; Schaeublin, R.; Li, C.; Yashima, E.; Pisula, W.; Müllen, K.; Wennemers, H. A Triaxial Supramolecular Weave. *Nat. Chem.* **2017**, *9* (11), 1068–1072. <https://doi.org/10.1038/nchem.2823>.
- (166) Guo, Y.; Nuermairaiti, A.; Kjeldsen, N. D.; Gothelf, K. V.; Linderoth, T. R. Two-Dimensional Coordination Networks from Cyclic Dipeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (47), 19814–19818. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c08700>.
- (167) Liu, L.; Zhang, L.; Mao, X.; Niu, L.; Yang, Y.; Wang, C. Chaperon-Mediated Single Molecular Approach Toward Modulating A $\beta$  Peptide Aggregation. *Nano Lett.* **2009**, *9* (12), 4066–4072. <https://doi.org/10.1021/nl902256b>.
- (168) Liu, L.; Li, Y.; Xia, D.; Bortolini, C.; Zhang, S.; Yang, Y.; Pedersen, J. S.; Wang, C.; Besenbacher, F.; Dong, M. A Self-Assembled Nanopatch with Peptide–Organic Multilayers and Mechanical Properties. *Nanoscale* **2015**, *7* (6), 2250–2254. <https://doi.org/10.1039/C4NR03797A>.
- (169) Zou, Y.; Tu, B.; Yu, L.; Zheng, Y.; Lin, Y.; Luo, W.; Yang, Y.; Fang, Q.; Wang, C. Peptide Conformation and Oligomerization Characteristics of Surface-Mediated Assemblies Revealed by Molecular Dynamics Simulations and Scanning Tunneling Microscopy. *RSC Adv.* **2019**, *9* (70), 41345–41350. <https://doi.org/10.1039/C9RA09320F>.
- (170) Li, Q.; Liu, L.; Zhang, S.; Xu, M.; Wang, X.; Wang, C.; Besenbacher, F.; Dong, M. Modulating A $\beta$  33–42 Peptide Assembly by Graphene Oxide. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20* (24), 7236–7240. <https://doi.org/10.1002/chem.201402022>.
- (171) Pan, Y.; Liu, C.; Zhang, S.; Yu, Y.; Dong, M. 2D-Oriented Self-Assembly of Peptides Induced by Hydrated Electrons. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18* (46), 14614–14617. <https://doi.org/10.1002/chem.201200745>.
- (172) Pandey, G.; Saikia, J.; Sasidharan, S.; Joshi, D. C.; Thota, S.; Nemade, H. B.; Chaudhary, N.; Ramakrishnan, V. Modulation of Peptide Based Nano-Assemblies with Electric and Magnetic Fields. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 2726. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02609-z>.

- (173) Jang, H.-S.; Lee, J.-H.; Park, Y.-S.; Kim, Y.-O.; Park, J.; Yang, T.-Y.; Jin, K.; Lee, J.; Park, S.; You, J. M.; Jeong, K.-W.; Shin, A.; Oh, I.-S.; Kwon, M.-K.; Kim, Y.-I.; Cho, H.-H.; Han, H. N.; Kim, Y.; Chang, Y. H.; Paik, S. R.; Nam, K. T.; Lee, Y.-S. Tyrosine-Mediated Two-Dimensional Peptide Assembly and Its Role as a Bio-Inspired Catalytic Scaffold. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (1), 3665. <https://doi.org/10.1038/ncomms4665>.
- (174) Sun, H.; Luo, Q.; Hou, C.; Liu, J. Nanostructures Based on Protein Self-Assembly: From Hierarchical Construction to Bioinspired Materials. *Nano Today* **2017**, *14*, 16–41. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2017.04.006>.
- (175) Yang, L.; Liu, A.; Cao, S.; Putri, R. M.; Jonkheijm, P.; Cornelissen, J. J. L. M. Self-Assembly of Proteins: Towards Supramolecular Materials. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22* (44), 15570–15582. <https://doi.org/10.1002/chem.201601943>.
- (176) Aebi, U.; Smith, P. R.; Dubochet, J.; Henry, C.; Kellenberger, E. A Study of the Structure of the T-Layer of *Bacillus Brevis*. *J. Supramol. Struct.* **1973**, *1* (6), 498–522. <https://doi.org/10.1002/jss.400010606>.
- (177) Sleytr, U. B. Regular Arrays of Macromolecules on Bacterial Cell Walls: Structure, Chemistry, Assembly, and Function. In *International Review of Cytology*; Elsevier, 1978; Vol. 53, pp 1–64. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62240-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62240-8).
- (178) Messner, P.; Pum, D.; Sleytr, U. B. Characterization of the Ultrastructure and the Self-Assembly of the Surface Layer of *Bacillus Stearothermophilus* Strain NRS 2004/3a. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **1986**, *97* (1–3), 73–88. [https://doi.org/10.1016/S0889-1605\(86\)80008-8](https://doi.org/10.1016/S0889-1605(86)80008-8).
- (179) Györfvay, E. S.; Stein, O.; Pum, D.; Sleytr, U. B. Self-Assembly and Recrystallization of Bacterial S-Layer Proteins at Silicon Supports Imaged in Real Time by Atomic Force Microscopy. *J. Microsc.* **2003**, *212* (3), 300–306. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2003.01270.x>.
- (180) Baneyx, F.; Matthaei, J. F. Self-Assembled Two-Dimensional Protein Arrays in Bionanotechnology: From S-Layers to Designed Lattices. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *28*, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.11.001>.
- (181) Zhao, L.; Zou, H.; Zhang, H.; Sun, H.; Wang, T.; Pan, T.; Li, X.; Bai, Y.; Qiao, S.; Luo, Q.; Xu, J.; Hou, C.; Liu, J. Enzyme-Triggered Defined Protein Nanoarrays: Efficient Light-Harvesting Systems to Mimic Chloroplasts. *ACS Nano* **2017**, *11* (1), 938–945. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07527>.
- (182) Zhou, K.; Chen, H.; Zhang, S.; Wang, Y.; Zhao, G. Disulfide-Mediated Reversible Two-Dimensional Self-Assembly of Protein Nanocages. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (52), 7510–7513. <https://doi.org/10.1039/C9CC03085A>.
- (183) Nguyen, T. K.; Negishi, H.; Abe, S.; Ueno, T. Construction of Supramolecular Nanotubes from Protein Crystals. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (4), 1046–1051. <https://doi.org/10.1039/C8SC04167A>.
- (184) Du, M.; Zhou, K.; Wang, X.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Dong, J.; Wu, L.; Qiao, Z.; Chen, G.; Wang, Q. Precise Fabrication of De Novo Nanoparticle Lattices on Dynamic 2D Protein Crystalline Lattices. *Nano Lett.* **2020**, *20* (2), 1154–1160. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b04574>.

- (185) Dudev, T.; Lim, C. Competition among Metal Ions for Protein Binding Sites: Determinants of Metal Ion Selectivity in Proteins. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (1), 538–556. <https://doi.org/10.1021/cr4004665>.
- (186) Matthaei, J. F.; DiMaio, F.; Richards, J. J.; Pozzo, L. D.; Baker, D.; Baneyx, F. Designing Two-Dimensional Protein Arrays through Fusion of Multimers and Interface Mutations. *Nano Lett.* **2015**, *15* (8), 5235–5239. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b01499>.
- (187) Heyman, A.; Medalsy, I.; Dgany, O.; Porath, D.; Markovich, G.; Shoseyov, O. Float and Compress: Honeycomb-like Array of a Highly Stable Protein Scaffold. *Langmuir* **2009**, *25* (9), 5226–5229. <https://doi.org/10.1021/la804132z>.
- (188) Zhang, W.; Luo, Q.; Miao, L.; Hou, C.; Bai, Y.; Dong, Z.; Xu, J.; Liu, J. Self-Assembly of Glutathione S-Transferase into Nanowires. *Nanoscale* **2012**, *4* (19), 5847. <https://doi.org/10.1039/c2nr31244a>.
- (189) Brodin, J. D.; Ambroggio, X. I.; Tang, C.; Parent, K. N.; Baker, T. S.; Tezcan, F. A. Metal-Directed, Chemically Tunable Assembly of One-, Two- and Three-Dimensional Crystalline Protein Arrays. *Nat. Chem.* **2012**, *4* (5), 375–382. <https://doi.org/10.1038/nchem.1290>.
- (190) Yang, M.; Song, W. J. Diverse Protein Assembly Driven by Metal and Chelating Amino Acids with Selectivity and Tunability. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13491-w>.
- (191) Zhang, J.; Wang, X.; Zhou, K.; Chen, G.; Wang, Q. Self-Assembly of Protein Crystals with Different Crystal Structures Using Tobacco Mosaic Virus Coat Protein as a Building Block. *ACS Nano* **2018**, *12* (2), 1673–1679. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08316>.
- (192) Suzuki, Y.; Cardone, G.; Restrepo, D.; Zavattieri, P. D.; Baker, T. S.; Tezcan, F. A. Self-Assembly of Coherently Dynamic, Auxetic, Two-Dimensional Protein Crystals. *Nature* **2016**, *533* (7603), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature17633>.
- (193) De Benedetti, P.; Fanelli, F. Ligand-Receptor Communication and Drug Design. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2009**, *10* (2), 186–193. <https://doi.org/10.2174/138920309787847581>.
- (194) Yang, G.; Ding, H.; Kochovski, Z.; Hu, R.; Lu, Y.; Ma, Y.; Chen, G.; Jiang, M. Highly Ordered Self-Assembly of Native Proteins into 1D, 2D, and 3D Structures Modulated by the Tether Length of Assembly-Inducing Ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (36), 10691–10695. <https://doi.org/10.1002/anie.201703052>.
- (195) Sakai, F.; Yang, G.; Weiss, M. S.; Liu, Y.; Chen, G.; Jiang, M. Protein Crystalline Frameworks with Controllable Interpenetration Directed by Dual Supramolecular Interactions. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (1). <https://doi.org/10.1038/ncomms5634>.
- (196) Bai, W.; Sargent, C. J.; Choi, J.-M.; Pappu, R. V.; Zhang, F. Covalently-Assembled Single-Chain Protein Nanostructures with Ultra-High Stability. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11285-8>.
- (197) Sinclair, J. C.; Davies, K. M.; Vénien-Bryan, C.; Noble, M. E. M. Generation of Protein Lattices by Fusing Proteins with Matching Rotational Symmetry. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6* (9), 558–562. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.122>.

- (198) Li, X.; Bai, Y.; Huang, Z.; Si, C.; Dong, Z.; Luo, Q.; Liu, J. A Highly Controllable Protein Self-Assembly System with Morphological Versatility Induced by Reengineered Host–Guest Interactions. *Nanoscale* **2017**, *9* (23), 7991–7997. <https://doi.org/10.1039/C7NR01612C>.
- (199) Lo, V.; Ren, Q.; Pham, C.; Morris, V.; Kwan, A.; Sunde, M. Fungal Hydrophobin Proteins Produce Self-Assembling Protein Films with Diverse Structure and Chemical Stability. *Nanomaterials* **2014**, *4* (3), 827–843. <https://doi.org/10.3390/nano4030827>.
- (200) Zheng, B.; Zhou, K.; Zhang, T.; Lv, C.; Zhao, G. Designed Two- and Three-Dimensional Protein Nanocage Networks Driven by Hydrophobic Interactions Contributed by Amyloidogenic Motifs. *Nano Lett.* **2019**, *19* (6), 4023–4028. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b01365>.
- (201) Yang, R.; Chen, L.; Yang, S.; Lv, C.; Leng, X.; Zhao, G. 2D Square Arrays of Protein Nanocages through Channel-Directed Electrostatic Interactions with Poly( $\alpha$ , L-Lysine). *Chem. Commun.* **2014**, *50* (22), 2879. <https://doi.org/10.1039/c3cc49306g>.
- (202) Zhou, K.; Zang, J.; Chen, H.; Wang, W.; Wang, H.; Zhao, G. On-Axis Alignment of Protein Nanocage Assemblies from 2D to 3D through the Aromatic Stacking Interactions of Amino Acid Residues. *ACS Nano* **2018**, *12* (11), 11323–11332. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b06091>.
- (203) Jacquier, E.; Jouneau, P.-H.; Falconet, D.; Mariolle, D.; Thévenon, E.; Si Larbi, G.; Tiron, R.; Parcy, F.; Elchinger, P.-H.; Dumas, R. Self-Assembly of a Ginkgo Oligomerization Domain Creates a Sub-10-Nm Honeycomb Architecture on Carbon and Silicon Surfaces with Customizable Pores: Implications for Nanoelectronics, Biosensing, and Biocatalysis. *ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, *4* (9), 9518–9526. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c01944>.
- (204) Gonen, S.; DiMaio, F.; Gonen, T.; Baker, D. Design of Ordered Two-Dimensional Arrays Mediated by Noncovalent Protein–Protein Interfaces. *Science* **2015**, *348* (6241), 1365–1368. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9897>.
- (205) Chen, Z.; Johnson, M. C.; Chen, J.; Bick, M. J.; Boyken, S. E.; Lin, B.; De Yoreo, J. J.; Kollman, J. M.; Baker, D.; DiMaio, F. Self-Assembling 2D Arrays with *de Novo* Protein Building Blocks. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (22), 8891–8895. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b01978>.
- (206) Pyles, H.; Zhang, S.; De Yoreo, J. J.; Baker, D. Controlling Protein Assembly on Inorganic Crystals through Designed Protein Interfaces. *Nature* **2019**, *571* (7764), 251–256. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1361-6>.
- (207) Park, W. M.; Bedewy, M.; Berggren, K. K.; Keating, A. E. Modular Assembly of a Protein Nanotriangle Using Orthogonally Interacting Coiled Coils. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10918-6>.
- (208) Brodin, J. D.; Carr, J. R.; Sontz, P. A.; Tezcan, F. A. Exceptionally Stable, Redox-Active Supramolecular Protein Assemblies with Emergent Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (8), 2897–2902. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319866111>.
- (209) Cummins, C.; Ghoshal, T.; Holmes, J. D.; Morris, M. A. Strategies for Inorganic Incorporation Using Neat Block Copolymer Thin Films for Etch Mask Function and Nanotechnological Application. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (27), 5586–5618. <https://doi.org/10.1002/adma.201503432>.

- (210) Pang, Y.; Jin, X.; Huang, G.; Wan, L.; Ji, S. Directed Self-Assembly of Styrene-Methyl Acrylate Block Copolymers with Sub-7 Nm Features via Thermal Annealing. *Macromolecules* **2019**, *52* (8), 2987–2994. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b00174>.
- (211) Diagne, C. T.; Brun, C.; Gasparutto, D.; Baillin, X.; Tiron, R. DNA Origami Mask for Sub-Ten-Nanometer Lithography. *ACS Nano* **2016**, *10* (7), 6458–6463. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b00413>.
- (212) Shen, B.; Linko, V.; Tapio, K.; Pikker, S.; Lemma, T.; Gopinath, A.; Gothelf, K. V.; Kostiainen, M. A.; Toppari, J. J. Plasmonic Nanostructures through DNA-Assisted Lithography. *Sci. Adv.* **2018**, *4* (2), eaap8978. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aap8978>.
- (213) Tian, C.; Kim, H.; Sun, W.; Kim, Y.; Yin, P.; Liu, H. DNA Nanostructures-Mediated Molecular Imprinting Lithography. *ACS Nano* **2017**, *11* (1), 227–238. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b04777>.
- (214) Piskunen, P.; Shen, B.; Keller, A.; Toppari, J. J.; Kostiainen, M. A.; Linko, V. Biotemplated Lithography of Inorganic Nanostructures (BLIN) for Versatile Patterning of Functional Materials. *ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, *4* (1), 529–538. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c02849>.
- (215) Pal, R. K.; Kurland, N. E.; Jiang, C.; Kundu, S. C.; Zhang, N.; Yadavalli, V. K. Fabrication of Precise Shape-Defined Particles of Silk Proteins Using Photolithography. *Eur. Polym. J.* **2016**, *85*, 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.10.038>.
- (216) Han, T. H.; Ok, T.; Kim, J.; Shin, D. O.; Ihee, H.; Lee, H.-S.; Kim, S. O. Bionanosphere Lithography via Hierarchical Peptide Self-Assembly of Aromatic Triphenylalanine. *Small* **2010**, *6* (8), 945–951. <https://doi.org/10.1002/smll.200902050>.
- (217) Kim, S.; Lee, S. E.; Park, J. H.; Shin, J. Y.; Lee, B.; Lim, H. Y.; Oh, Y. T.; Hwang, J. P.; Seon, S. W.; Kim, S. H.; Yu, T. S.; Kim, B. H. High Performance Field-Effect Transistors Based on Partially Suspended 2D Materials via Block Copolymer Lithography. *Polymers* **2021**, *13* (4), 566. <https://doi.org/10.3390/polym13040566>.
- (218) Cipriano, T.; Knotts, G.; Laudari, A.; Bianchi, R. C.; Alves, W. A.; Guha, S. Bioinspired Peptide Nanostructures for Organic Field-Effect Transistors. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (23), 21408–21415. <https://doi.org/10.1021/am5064124>.
- (219) Moudgil, A.; Kalyani, N.; Sinsinbar, G.; Das, S.; Mishra, P. S-Layer Protein for Resistive Switching and Flexible Nonvolatile Memory Device. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (5), 4866–4873. <https://doi.org/10.1021/acsam.7b15062>.
- (220) Aryal, B. R.; Ranasinghe, D. R.; Westover, T. R.; Calvopiña, D. G.; Davis, R. C.; Harb, J. N.; Woolley, A. T. DNA Origami Mediated Electrically Connected Metal–Semiconductor Junctions. *Nano Res* **2020**, *13* (5), 1419–1426.
- (221) Bathe, M.; Chrisey, L. A.; Herr, D. J. C.; Lin, Q.; Rasic, D.; Woolley, A. T.; Zedegan, R. M.; Zhirnov, V. V. Roadmap on Biological Pathways for Electronic Nanofabrication and Materials. *Nano Futur.* **2019**, *3* (1), 012001. <https://doi.org/10.1088/2399-1984/aaf7d5>.
- (222) Cui, C.; Park, D. H.; Ahn, D. J. Organic Semiconductor–DNA Hybrid Assemblies. *Adv. Mater.* **2020**, *32* (51), 2002213. <https://doi.org/10.1002/adma.202002213>.

- (223) Carmeli, I.; Frolov, L.; Carmeli, C.; Richter, S. Photovoltaic Activity of Photosystem I-Based Self-Assembled Monolayer. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (41), 12352–12353. <https://doi.org/10.1021/ja073040c>.
- (224) Das, R.; Kiley, P. J.; Segal, M.; Norville, J.; Yu, A. A.; Wang, L.; Trammell, S. A.; Reddick, L. E.; Kumar, R.; Stellacci, F.; Lebedev, N.; Schnur, J.; Bruce, B. D.; Zhang, S.; Baldo, M. Integration of Photosynthetic Protein Molecular Complexes in Solid-State Electronic Devices. *Nano Lett.* **2004**, *4* (6), 1079–1083. <https://doi.org/10.1021/nl049579f>.
- (225) Ha, D.; Fang, Z.; Hu, L.; Munday, J. N. Paper-Based Anti-Reflection Coatings for Photovoltaics. *Adv. Energy Mater.* **2014**, *4* (9), 1301804. <https://doi.org/10.1002/aenm.201301804>.
- (226) Adak, D.; Ghosh, S.; Chakraborty, P.; Srivatsa, K. M. K.; Mondal, A.; Saha, H.; Mukherjee, R.; Bhattacharyya, R. Non Lithographic Block Copolymer Directed Self-Assembled and Plasma Treated Self-Cleaning Transparent Coating for Photovoltaic Modules and Other Solar Energy Devices. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2018**, *188*, 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2018.08.011>.
- (227) Poskela, A.; Miettunen, K.; Borghei, M.; Vapaavuori, J.; Greca, L. G.; Lehtonen, J.; Solin, K.; Ago, M.; Lund, P. D.; Rojas, O. J. Nanocellulose and Nanochitin Cryogels Improve the Efficiency of Dye Solar Cells. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7* (12), 10257–10265. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06501>.
- (228) Ling, S.; Chen, W.; Fan, Y.; Zheng, K.; Jin, K.; Yu, H.; Buehler, M. J.; Kaplan, D. L. Biopolymer Nanofibrils: Structure, Modeling, Preparation, and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2018**, *85*, 1–56. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.06.004>.
- (229) Or, T.; Miettunen, K.; Cranston, E. D.; Moran-Mirabal, J. M.; Vapaavuori, J. Cellulose Nanocrystal Aerogels as Electrolyte Scaffolds for Glass and Plastic Dye-Sensitized Solar Cells. *ACS Appl. Energy Mater.* **2019**, *2* (8), 5635–5642. <https://doi.org/10.1021/acsaem.9b00795>.
- (230) Chen, W.-C.; Lee, Y.-H.; Chen, C.-Y.; Kau, K.-C.; Lin, L.-Y.; Dai, C.-A.; Wu, C.-G.; Ho, K.-C.; Wang, J.-K.; Wang, L. Self-Assembled All-Conjugated Block Copolymer as an Effective Hole Conductor for Solid-State Dye-Sensitized Solar Cells. *ACS Nano* **2014**, *8* (2), 1254–1262. <https://doi.org/10.1021/nn404346v>.
- (231) Ateş Sönmezoğlu, Ö.; Akin, S.; Terzi, B.; Mutlu, S.; Sönmezoğlu, S. An Effective Approach for High-Efficiency Photoelectrochemical Solar Cells by Using Bifunctional DNA Molecules Modified Photoanode. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26* (47), 8776–8783. <https://doi.org/10.1002/adfm.201603454>.
- (232) Charalambidis, G.; Karikis, K.; Georgilis, E.; M'Sabah, B. L.; Pellegrin, Y.; Planchat, A.; Lucas, B.; Mitraki, A.; Bouclé, J.; Odobel, F.; Coutsolelos, A. G. Supramolecular Architectures Featuring the Antenna Effect in Solid State DSSCs. *Sustain. Energy Fuels* **2017**, *1* (2), 387–395. <https://doi.org/10.1039/C6SE00051G>.
- (233) Mitchell, V. D.; Gann, E.; Huettner, S.; Singh, C. R.; Subbiah, J.; Thomsen, L.; McNeill, C. R.; Thelakkat, M.; Jones, D. J. Morphological and Device Evaluation of an Amphiphilic Block

- Copolymer for Organic Photovoltaic Applications. *Macromolecules* **2017**, *50* (13), 4942–4951. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b00377>.
- (234) Hutnan, M. P. J.; Kaake, L. G. Design Principles for Block Polymer Organic Double Heterojunction Solar Cells. *Mater. Horiz.* **2016**, *3* (6), 575–580. <https://doi.org/10.1039/C6MH00293E>.
- (235) Shi, D.; Wang, H.; Sun, H.; Yuan, W.; Wang, S.; Huang, W. Improved Efficiency of Single-Component Active Layer Photovoltaics by Optimizing Conjugated Diblock Copolymers. *New J. Chem.* **2020**, *44* (7), 2714–2720. <https://doi.org/10.1039/C9NJ05869A>.
- (236) Park, J. B.; Isik, M.; Park, H. J.; Jung, I. H.; Mecerreyes, D.; Hwang, D.-H. Polystyrene-Block-Poly(Ionic Liquid) Copolymers as Work Function Modifiers in Inverted Organic Photovoltaic Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (5), 4887–4894. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b17635>.
- (237) Peng, X.; Lu, H.; Zhuang, J.; Liu, X.; Ma, Z.; Wang, H.; Guo, Z.; Wang, Q.; Zhang, H.; Zhao, S. Enhanced Performance of Perovskite Solar Cells Using DNA-Doped Mesoporous-TiO<sub>2</sub> as Electron Transporting Layer. *Sol. Energy* **2020**, *206*, 855–863. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2020.06.064>.
- (238) Hou, Y.; Wang, K.; Yang, D.; Jiang, Y.; Yennawar, N.; Wang, K.; Sanghadasa, M.; Wu, C.; Priya, S. Enhanced Performance and Stability in DNA-Perovskite Heterostructure-Based Solar Cells. *ACS Energy Lett.* **2019**, *4* (11), 2646–2655. <https://doi.org/10.1021/acsenergylett.9b01894>.
- (239) Palacín, M. R. Recent Advances in Rechargeable Battery Materials: A Chemist's Perspective. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (9), 2565. <https://doi.org/10.1039/b820555h>.
- (240) Cabana, J.; Monconduit, L.; Larcher, D.; Palacín, M. R. Beyond Intercalation-Based Li-Ion Batteries: The State of the Art and Challenges of Electrode Materials Reacting Through Conversion Reactions. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (35), E170–E192. <https://doi.org/10.1002/adma.201000717>.
- (241) Wang, X.; Liu, S.; Zhang, Y.; Wang, H.; Aboalhassan, A. A.; Li, G.; Xu, G.; Xue, C.; Yu, J.; Yan, J.; Ding, B. Highly Elastic Block Copolymer Binders for Silicon Anodes in Lithium-Ion Batteries. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (34), 38132–38139. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c10005>.
- (242) Nguyen, H.-D.; Kim, G.-T.; Shi, J.; Paillard, E.; Judeinstein, P.; Lyonard, S.; Bresser, D.; Iojoiu, C. Nanostructured Multi-Block Copolymer Single-Ion Conductors for Safer High-Performance Lithium Batteries. *Energy Environ. Sci.* **2018**, *11* (11), 3298–3309. <https://doi.org/10.1039/C8EE02093K>.
- (243) Yang, H.; Shi, X.; Chu, S.; Shao, Z.; Wang, Y. Design of Block-Copolymer Nanoporous Membranes for Robust and Safer Lithium-Ion Battery Separators. *Adv. Sci.* **2021**, *8* (7), 2003096. <https://doi.org/10.1002/advs.202003096>.
- (244) Lin, Z.; Guo, X.; Yang, Y.; Tang, M.; Wei, Q.; Yu, H. Block Copolymer Electrolyte with Adjustable Functional Units for Solid Polymer Lithium Metal Battery. *J. Energy Chem.* **2021**, *52*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2020.04.052>.

- (245) Liu, C.; Xu, W.; Mei, C.; Li, M.; Chen, W.; Hong, S.; Kim, W.; Lee, S.; Wu, Q. A Chemically Self-Charging Flexible Solid-State Zinc-Ion Battery Based on VO<sub>2</sub> Cathode and Polyacrylamide–Chitin Nanofiber Hydrogel Electrolyte. *Adv. Energy Mater.* **2021**, *11* (25), 2003902. <https://doi.org/10.1002/aenm.202003902>.
- (246) Zhang, T.-W.; Shen, B.; Yao, H.-B.; Ma, T.; Lu, L.-L.; Zhou, F.; Yu, S.-H. Prawn Shell Derived Chitin Nanofiber Membranes as Advanced Sustainable Separators for Li/Na-Ion Batteries. *Nano Lett.* **2017**, *17* (8), 4894–4901. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b01875>.
- (247) Chen, C.; Lee, S. H.; Cho, M.; Kim, J.; Lee, Y. Cross-Linked Chitosan as an Efficient Binder for Si Anode of Li-Ion Batteries. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (4), 2658–2665. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b10673>.
- (248) Gao, H.; Zhou, W.; Jang, J.-H.; Goodenough, J. B. Cross-Linked Chitosan as a Polymer Network Binder for an Antimony Anode in Sodium-Ion Batteries. *Adv. Energy Mater.* **2016**, *6* (6), 1502130. <https://doi.org/10.1002/aenm.201502130>.
- (249) Kim, K.; Kim, P. J.; Chowdhury, R. A.; Kantharaj, R.; Candadai, A.; Marconnet, A.; Pol, V. G.; Youngblood, J. P. Structural Orientation Effect of Cellulose Nanocrystals (CNC) Films on Electrochemical Kinetics and Stability in Lithium-Ion Batteries. *Chem. Eng. J.* **2021**, *417*, 128128. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128128>.
- (250) Rani, M. S. A.; Mohammad, M.; Sua'it, M. S.; Ahmad, A.; Mohamed, N. S. Novel Approach for the Utilization of Ionic Liquid-Based Cellulose Derivative Biosourced Polymer Electrolytes in Safe Sodium-Ion Batteries. *Polym. Bull.* **2021**, *78* (9), 5355–5377. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03382-2>.
- (251) Li, S.; Warzywoda, J.; Wang, S.; Ren, G.; Fan, Z. Bacterial Cellulose Derived Carbon Nanofiber Aerogel with Lithium Polysulfide Catholyte for Lithium–Sulfur Batteries. *Carbon* **2017**, *124*, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.08.062>.
- (252) Kim, D. J.; Woo, M.-A.; Jung, Y. L.; Bharathi, K. K.; Park, H. G.; Kim, D. K.; Choi, J. W. DNA Metallization for High Performance Li-Ion Battery Anodes. *Nano Energy* **2014**, *8*, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2014.05.007>.
- (253) Guo, C. X.; Shen, Y. Q.; Dong, Z. L.; Chen, X. D.; Lou, X. W. (David); Li, C. M. DNA-Directed Growth of FePO<sub>4</sub> Nanostructures on Carbon Nanotubes to Achieve Nearly 100% Theoretical Capacity for Lithium-Ion Batteries. *Energy Environ. Sci.* **2012**, *5* (5), 6919. <https://doi.org/10.1039/c2ee21320f>.
- (254) Cho, S.-K.; Cho, S.-J.; Lee, S.-S.; Choi, K.-H.; Lee, S.-Y. DNA-Directed Amphiphilic Self-Assembly as a Chemifunctional/Multiscale-Structuring Strategy for High-Performance Li–S Batteries. *J. Mater. Chem. A* **2019**, *7* (8), 4084–4092. <https://doi.org/10.1039/C8TA11398J>.
- (255) Ryu, J.; Kim, S.-W.; Kang, K.; Park, C. B. Mineralization of Self-Assembled Peptide Nanofibers for Rechargeable Lithium Ion Batteries. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (48), 5537–5541. <https://doi.org/10.1002/adma.201000669>.
- (256) Susapto, H. H.; Kudu, O. U.; Garifullin, R.; Yilmaz, E.; Guler, M. O. One-Dimensional Peptide Nanostructure Templated Growth of Iron Phosphate Nanostructures for Lithium-Ion Battery Cathodes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (27), 17421–17427. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b02528>.

- (257) Ryu, J.; Kim, S.-W.; Kang, K.; Park, C. B. Synthesis of Diphenylalanine/Cobalt Oxide Hybrid Nanowires and Their Application to Energy Storage. *ACS Nano* **2010**, *4* (1), 159–164. <https://doi.org/10.1021/nn901156w>.
- (258) Royston, E.; Ghosh, A.; Kofinas, P.; Harris, M. T.; Culver, J. N. Self-Assembly of Virus-Structured High Surface Area Nanomaterials and Their Application as Battery Electrodes. *Langmuir* **2008**, *24* (3), 906–912. <https://doi.org/10.1021/la7016424>.
- (259) Akdim, B.; Pachter, R.; Naik, R. R. Self-Assembled Peptide Nanotubes as Electronic Materials: An Evaluation from First-Principles Calculations. *Appl. Phys. Lett.* **2015**, *106* (18), 183707. <https://doi.org/10.1063/1.4921012>.
- (260) Tao, K.; Xue, B.; Li, Q.; Hu, W.; Shimon, L. J. W.; Makam, P.; Si, M.; Yan, X.; Zhang, M.; Cao, Y.; Yang, R.; Li, J.; Gazit, E. Stable and Optoelectronic Dipeptide Assemblies for Power Harvesting. *Mater. Today* **2019**, *30*, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2019.04.002>.
- (261) Xu, H.; Das, A. K.; Horie, M.; Shaik, M. S.; Smith, A. M.; Luo, Y.; Lu, X.; Collins, R.; Liem, S. Y.; Song, A.; Popelier, P. L. A.; Turner, M. L.; Xiao, P.; Kinloch, I. A.; Ulijn, R. V. An Investigation of the Conductivity of Peptide Nanotube Networks Prepared by Enzyme-Triggered Self-Assembly. *Nanoscale* **2010**, *2* (6), 960. <https://doi.org/10.1039/b9nr00233b>.
- (262) Liu, X.; Zhang, F.; Jing, X.; Pan, M.; Liu, P.; Li, W.; Zhu, B.; Li, J.; Chen, H.; Wang, L.; Lin, J.; Liu, Y.; Zhao, D.; Yan, H.; Fan, C. Complex Silica Composite Nanomaterials Templated with DNA Origami. *Nature* **2018**, *559* (7715), 593–598. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0332-7>.
- (263) Fu, X.; Li, C.; Wang, Y.; Scudiero, L.; Liu, J.; Zhong, W.-H. Self-Assembled Protein Nanofilter for Trapping Polysulfides and Promoting Li<sup>+</sup> Transport in Lithium–Sulfur Batteries. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9* (10), 2450–2459. <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.8b00836>.
- (264) He, J.; Wei, Y.; Zhai, T.; Li, H. Antimony-Based Materials as Promising Anodes for Rechargeable Lithium-Ion and Sodium-Ion Batteries. *Mater. Chem. Front.* **2018**, *2* (3), 437–455. <https://doi.org/10.1039/C7QM00480J>.
- (265) Young, W.-S.; Kuan, W.-F.; Epps, T. H. Block Copolymer Electrolytes for Rechargeable Lithium Batteries. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2014**, *52* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1002/polb.23404>.
- (266) Phan, T. N.; Issa, S.; Gigmes, D. Poly(Ethylene Oxide)-Based Block Copolymer Electrolytes for Lithium Metal Batteries: PEO-Based BCEs for LMBs. *Polym. Int.* **2019**, *68* (1), 7–13. <https://doi.org/10.1002/pi.5677>.
- (267) Liu, H.; Wang, Y.; Li, Z.; Yao, Z.; Lin, J.; Sun, Y.; Li, Z. DNA-Assisted Synthesis of Nickel Cobalt Sulfide Nanosheets as High-Performance Battery-Type Electrode Materials. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *528*, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.05.074>.
- (268) Jiang, S.; Zhang, M.; Li, M.; Zhu, J.; Ge, A.; Liu, L.; Yu, J. Cellulose-Based Composite Thermal-Insulating Foams toward Eco-Friendly, Flexible and Flame-Retardant. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *273*, 118544. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118544>.
- (269) Zhang, Z.; Fang, Z.; Xiang, Y.; Liu, D.; Xie, Z.; Qu, D.; Sun, M.; Tang, H.; Li, J. Cellulose-Based Material in Lithium-Sulfur Batteries: A Review. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *255*, 117469. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117469>.

- (270) Fu, X.; Scudiero, L.; Zhong, W.-H. A Robust and Ion-Conductive Protein-Based Binder Enabling Strong Polysulfide Anchoring for High-Energy Lithium–Sulfur Batteries. *J. Mater. Chem. A* **2019**, *7* (4), 1835–1848. <https://doi.org/10.1039/C8TA11384J>.
- (271) Balli, B.; Şavk, A.; Şen, F. Graphene and Polymer Composites for Supercapacitor Applications. In *Nanocarbon and its Composites*; Elsevier, 2019; pp 123–151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102509-3.00005-5>.
- (272) Jiao, F.; Edberg, J.; Zhao, D.; Puzinas, S.; Khan, Z. U.; Mäkie, P.; Naderi, A.; Lindström, T.; Odén, M.; Engquist, I.; Berggren, M.; Crispin, X. Nanofibrillated Cellulose-Based Electrolyte and Electrode for Paper-Based Supercapacitors. *Adv. Sustain. Syst.* **2018**, *2* (1), 1700121. <https://doi.org/10.1002/adsu.201700121>.
- (273) Islam, Md. A.; Ong, H. L.; Villagracia, A. R.; A. Halim, K. A.; Ganganboina, A. B.; Doong, R.-A. Biomass-Derived Cellulose Nanofibrils Membrane from Rice Straw as Sustainable Separator for High Performance Supercapacitor. *Ind. Crops Prod.* **2021**, *170*, 113694. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113694>.
- (274) Ye, D.; Zuo, X.; Fan, C. DNA Nanotechnology-Enabled Interfacial Engineering for Biosensor Development. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2018**, *11* (1), 171–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061417-010007>.
- (275) Wang, S.; Zhou, Z.; Ma, N.; Yang, S.; Li, K.; Teng, C.; Ke, Y.; Tian, Y. DNA Origami-Enabled Biosensors. *Sensors* **2020**, *20* (23), 6899. <https://doi.org/10.3390/s20236899>.
- (276) Ito, T.; Ghimire, G. Electrochemical Applications of Microphase-Separated Block Copolymer Thin Films. *ChemElectroChem* **2018**, *5* (20), 2937–2953. <https://doi.org/10.1002/celec.201800576>.
- (277) Fan, J.; Zhang, S.; Li, F.; Yang, Y.; Du, M. Recent Advances in Cellulose-Based Membranes for Their Sensing Applications. *Cellulose* **2020**, *27* (16), 9157–9179. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03445-7>.
- (278) Yuan, L.; Liu, L. Peptide-Based Electrochemical Biosensing. *Sens. Actuators B Chem.* **2021**, *344*, 130232. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130232>.
- (279) Schuster, B. S-Layer Protein-Based Biosensors. *Biosensors* **2018**, *8* (2), 40. <https://doi.org/10.3390/bios8020040>.
- (280) Zhou, C.; Yang, Y.; Li, H.; Gao, F.; Song, C.; Yang, D.; Xu, F.; Liu, N.; Ke, Y.; Su, S.; Wang, P. Programming Surface-Enhanced Raman Scattering of DNA Origami-Templated Metamolecules. *Nano Lett.* **2020**, *20* (5), 3155–3159. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b05161>.
- (281) Prinz, J.; Schreiber, B.; Olejko, L.; Oertel, J.; Rackwitz, J.; Keller, A.; Bald, I. DNA Origami Substrates for Highly Sensitive Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4* (23), 4140–4145. <https://doi.org/10.1021/jz402076b>.
- (282) Kühler, P.; Roller, E.-M.; Schreiber, R.; Liedl, T.; Lohmüller, T.; Feldmann, J. Plasmonic DNA-Origami Nanoantennas for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Nano Lett.* **2014**, *14* (5), 2914–2919. <https://doi.org/10.1021/nl5009635>.
- (283) Lu, M.; Peng, W.; Lin, M.; Wang, F.; Zhang, Y. Gold Nanoparticle-Enhanced Detection of DNA Hybridization by a Block Copolymer-Templating Fiber-Optic Localized Surface

- Plasmon Resonance Biosensor. *Nanomaterials* **2021**, *11* (3), 616. <https://doi.org/10.3390/nano11030616>.
- (284) Shin, D. O.; Jeong, J.-R.; Han, T. H.; Koo, C. M.; Park, H.-J.; Lim, Y. T.; Kim, S. O. A Plasmonic Biosensor Array by Block Copolymer Lithography. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (34), 7241. <https://doi.org/10.1039/c0jm01319f>.
- (285) Olejko, L.; Bald, I. FRET Efficiency and Antenna Effect in Multi-Color DNA Origami-Based Light Harvesting Systems. *RSC Adv.* **2017**, *7* (39), 23924–23934. <https://doi.org/10.1039/C7RA02114C>.
- (286) Wijerathne, N. K.; Kumar, M.; Ulijn, R. V. Fmoc-Dipeptide/Porphyrin Molar Ratio Dictates Energy Transfer Efficiency in Nanostructures Produced by Biocatalytic Co-Assembly. *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25* (51), 11847–11851. <https://doi.org/10.1002/chem.201902819>.
- (287) Shen, C.; Zeng, K.; Luo, J.; Li, X.; Yang, M.; Rasooly, A. Self-Assembled DNA Generated Electric Current Biosensor for HER2 Analysis. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (19), 10264–10269. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01747>.
- (288) Bianchi, R. C.; da Silva, E. R.; Dall'Antonia, L. H.; Ferreira, F. F.; Alves, W. A. A Nonenzymatic Biosensor Based on Gold Electrodes Modified with Peptide Self-Assemblies for Detecting Ammonia and Urea Oxidation. *Langmuir* **2014**, *30* (38), 11464–11473. <https://doi.org/10.1021/la502315m>.
- (289) Adler-Abramovich, L.; Badihi-Mossberg, M.; Gazit, E.; Rishpon, J. Characterization of Peptide-Nanostructure-Modified Electrodes and Their Application for Ultrasensitive Environmental Monitoring. *Small* **2010**, *6* (7), 825–831. <https://doi.org/10.1002/sml.200902186>.
- (290) Conroy, D. J. R.; Millner, P. A.; Stewart, D. I.; Pollmann, K. Biosensing for the Environment and Defence: Aqueous Uranyl Detection Using Bacterial Surface Layer Proteins. *Sensors* **2010**, *10* (5), 4739–4755. <https://doi.org/10.3390/s100504739>.
- (291) Naghdi, T.; Golmohammadi, H.; Yousefi, H.; Hosseinifard, M.; Kostiv, U.; Horák, D.; Merkoçi, A. Chitin Nanofiber Paper toward Optical (Bio)Sensing Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (13), 15538–15552. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b23487>.
- (292) Zhao, S.; You, B.; Jiang, L. Oriented Assembly of Zinc Oxide Mesocrystal in Chitosan and Applications for Glucose Biosensors. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16* (6), 3359–3365. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00337>.
- (293) Swaminathan, N.; Sharma, N.; Nerthigan, Y.; Wu, H.-F. Self-Assembled Diphenylalanine-Zinc Oxide Hybrid Nanostructures as a Highly Selective Luminescent Biosensor for Trypsin Detection. *Appl. Surf. Sci.* **2021**, *554*, 149600. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.149600>.
- (294) Chen, R.; Huang, W.-C.; Wang, W.; Mao, X. Characterization of TEMPO-Oxidized Chitin Nanofibers with Various Oxidation Times and Its Application as an Enzyme Immobilization Support. *Mar. Life Sci. Technol.* **2021**, *3* (1), 85–93. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00054-y>.
- (295) Díaz-Caballero, M.; Navarro, S.; Ventura, S. Functionalized Prion-Inspired Amyloids for Biosensor Applications. *Biomacromolecules* **2021**, *22* (7), 2822–2833. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00222>.

- (296) Gong, W.; Han, Q.; Chen, Y.; Wang, B.; Shi, J.; Wang, L.; Cai, L.; Meng, Q.; Zhang, Z.; Liu, Q.; Yang, Y.; Yang, J.; Zheng, L.; Li, Y.; Ma, Y. A Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase Fused to a Carbohydrate Binding Module Family 2 Tag That Specifically Binds to the Cellulose-Modified Electrode. *Enzyme Microb. Technol.* **2021**, *150*, 109869. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109869>.
- (297) Guo, T.; Gao, J.; Qin, X.; Zhang, X.; Xue, H. A Novel Glucose Biosensor Based on Hierarchically Porous Block Copolymer Film. *Polymers* **2018**, *10* (7), 723. <https://doi.org/10.3390/polym10070723>.
- (298) Lee, J.; Ahn, H.; Choi, I.; Boese, M.; Park, M. J. Enhanced Charge Transport in Enzyme-Wired Organometallic Block Copolymers for Bioenergy and Biosensors. *Macromolecules* **2012**, *45* (7), 3121–3128. <https://doi.org/10.1021/ma300155u>.
- (299) Neubauerova, K.; Carneiro, M. C. C. G.; Rodrigues, L. R.; Moreira, F. T. C.; Sales, M. G. F. Nanocellulose- Based Biosensor for Colorimetric Detection of Glucose. *Sens. Bio-Sens. Res.* **2020**, *29*, 100368. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2020.100368>.
- (300) Wang, D.; Chai, Y.; Yuan, Y.; Yuan, R. Lattice-Like DNA Tetrahedron Nanostructure as Scaffold to Locate GOx and HRP Enzymes for Highly Efficient Enzyme Cascade Reaction. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (2), 2871–2877. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b18702>.
- (301) Yemini, M.; Reches, M.; Gazit, E.; Rishpon, J. Peptide Nanotube-Modified Electrodes for Enzyme–Biosensor Applications. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (16), 5155–5159. <https://doi.org/10.1021/ac050414g>.
- (302) Xu, J.; Zhu, Z.; Xue, H. Porous Polystyrene- Block -Poly(Acrylic Acid)/Hemoglobin Membrane Formed by Dually Driven Self-Assembly and Electrochemical Application. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (16), 8852–8858. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b01487>.
- (303) Lian, M.; Chen, X.; Lu, Y.; Yang, W. Self-Assembled Peptide Hydrogel as a Smart Biointerface for Enzyme-Based Electrochemical Biosensing and Cell Monitoring. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (38), 25036–25042. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b05409>.
- (304) Chen, Y.; Ke, G.; Ma, Y.; Zhu, Z.; Liu, M.; Liu, Y.; Yan, H.; Yang, C. J. A Synthetic Light-Driven Substrate Channeling System for Precise Regulation of Enzyme Cascade Activity Based on DNA Origami. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (28), 8990–8996. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b05429>.
- (305) Sun, C.; Gao, L.; Wang, D.; Zhang, M.; Liu, Y.; Geng, Z.; Xu, W.; Liu, F.; Bian, H. Biocompatible Polypyrrole-Block Copolymer-Gold Nanoparticles Platform for Determination of Inosine Monophosphate with Bi-Enzyme Biosensor. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *230*, 521–527. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.02.111>.
- (306) Allafchian, A. R.; Moini, E.; Mirahmadi-Zare, S. Z. Flower-Like Self-Assembly of Diphenylalanine for Electrochemical Human Growth Hormone Biosensor. *IEEE Sens. J.* **2018**, *18* (21), 8979–8985. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2018.2869071>.
- (307) MacArthur, K. E. The Use of Annular Dark-Field Scanning Transmission Electron Microscopy for Quantitative Characterisation. *Johns. Matthey Technol. Rev.* **2016**, *60* (2), 117–131. <https://doi.org/10.1595/205651316X691186>.

- (308) Gallagher, J. R.; Kim, A. J.; Gulati, N. M.; Harris, A. K. Negative-Stain Transmission Electron Microscopy of Molecular Complexes for Image Analysis by 2D Class Averaging. *Curr. Protoc. Microbiol.* **2019**, *54* (1). <https://doi.org/10.1002/cpmc.90>.
- (309) Nomaki, H.; Toyofuku, T.; Tsuchiya, M.; Matsuzaki, T.; Uematsu, K.; Tame, A. Three-Dimensional Observation of Foraminiferal Cytoplasmic Morphology and Internal Structures Using Uranium–Osmium Staining and Micro-X-Ray Computed Tomography. *Mar. Micropaleontol.* **2015**, *121*, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.marmicro.2015.09.003>.
- (310) Inkson, B. J. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization. In *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*; Elsevier, 2016; pp 17–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X>.
- (311) Huq, Md. A.; Akter, S. Biosynthesis, Characterization and Antibacterial Application of Novel Silver Nanoparticles against Drug Resistant Pathogenic Klebsiella Pneumoniae and Salmonella Enteritidis. *Molecules* **2021**, *26* (19), 5996. <https://doi.org/10.3390/molecules26195996>.
- (312) Sleytr, U. B.; Huber, C.; Ilk, N.; Pum, D.; Schuster, B.; Egelseer, E. M. S-Layers as a Tool Kit for Nanobiotechnological Applications. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *267* (2), 131–144. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00573.x>.
- (313) Sleytr, U. B. Self-Assembly of the Hexagonally and Tetragonally Arranged Subunits of Bacterial Surface Layers and Their Reattachment to Cell Walls. *J. Ultrastruct. Res.* **1976**, *55* (3), 360–377. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(76\)80093-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(76)80093-7).
- (314) Sayou, C.; Nanao, M. H.; Jamin, M.; Posé, D.; Thévenon, E.; Grégoire, L.; Tichtinsky, G.; Denay, G.; Ott, F.; Peirats Llobet, M.; Schmid, M.; Dumas, R.; Parcy, F. A SAM Oligomerization Domain Shapes the Genomic Binding Landscape of the LEAFY Transcription Factor. *Nat. Commun.* **2016**, *7* (1), 11222. <https://doi.org/10.1038/ncomms11222>.
- (315) Chiari, L.; Carpentier, P.; kieffer-jaquinod, S.; Gogny, A.; Perard, J.; Ravanel, S.; Cobessi, D.; Menage, S.; Dumas, R.; Hamelin, O. LEAFY Protein Crystals with a Honeycomb Structure as Platform for Selective Preparation of Outstanding Stable Bio-Hybrid Materials. *Nanoscale* **2021**. <https://doi.org/10.1039/D1NR00268F>.
- (316) Boutureira, O.; Bernardes, G. J. L. Advances in Chemical Protein Modification. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (5), 2174–2195. <https://doi.org/10.1021/cr500399p>.
- (317) Valenti, L. E.; De Pauli, C. P.; Giacomelli, C. E. The Binding of Ni(II) Ions to Hexahistidine as a Model System of the Interaction between Nickel and His-Tagged Proteins. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100* (2), 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.11.003>.
- (318) Wiedemair, J.; Menegazzo, N.; Pikarsky, J.; Booksh, K. S.; Mizaikoff, B.; Kranz, C. Novel Electrode Materials Based on Ion Beam Induced Deposition of Platinum Carbon Composites. *Electrochimica Acta* **2010**, *55* (20), 5725–5732. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.05.008>.
- (319) Chakrabarti, P. Geometry of Interaction of Metal Ions with Histidine Residues in Protein Structures. *Protein Eng. Des. Sel.* **1990**, *4* (1), 57–63. <https://doi.org/10.1093/protein/4.1.57>.

- (320) Zhang, S.; Alberstein, R. G.; De Yoreo, J. J.; Tezcan, F. A. Assembly of a Patchy Protein into Variable 2D Lattices via Tunable Multiscale Interactions. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 3770. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17562-1>.
- (321) Uchihashi, T.; Watanabe, Y.; Nakazaki, Y.; Yamasaki, T.; Watanabe, H.; Maruno, T.; Ishii, K.; Uchiyama, S.; Song, C.; Murata, K.; Iino, R.; Ando, T. Dynamic Structural States of ClpB Involved in Its Disaggregation Function. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 2147. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04587-w>.
- (322) Narayan, N.; Meiyazhagan, A.; Vajtai, R. Metal Nanoparticles as Green Catalysts. *Materials* **2019**, *12* (21), 3602. <https://doi.org/10.3390/ma12213602>.
- (323) Zhang, X.; Zhang, J.; Zhang, F.; Yu, S. Probing the Binding Affinity of Plasma Proteins Adsorbed on Au Nanoparticles. *Nanoscale* **2017**, *9* (14), 4787–4792. <https://doi.org/10.1039/C7NR01523B>.
- (324) Lévy, R.; Thanh, N. T. K.; Doty, R. C.; Hussain, I.; Nichols, R. J.; Schiffrin, D. J.; Brust, M.; Fernig, D. G. Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (32), 10076–10084. <https://doi.org/10.1021/ja0487269>.
- (325) Tan, Y. N.; Lee, J. Y.; Wang, D. I. C. Uncovering the Design Rules for Peptide Synthesis of Metal Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (16), 5677–5686. <https://doi.org/10.1021/ja907454f>.
- (326) Huang, J.; Xiang, Y.; Li, J.; Kong, Q.; Zhai, H.; Xu, R.; Yang, F.; Sun, X.; Guo, Y. A Novel Electrochemiluminescence Aptasensor Based on Copper-Gold Bimetallic Nanoparticles and Its Applications. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *194*, 113601. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113601>.
- (327) Shang, H.; Kim, D.; Wallentine, S. K.; Kim, M.; Hofmann, D. M.; Dasgupta, R.; Murphy, C. J.; Asthagiri, A.; Baker, L. R. Ensemble Effects in Cu/Au Ultrasmall Nanoparticles Control the Branching Point for C1 Selectivity during CO<sub>2</sub> Electroreduction. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (26), 9146–9152. <https://doi.org/10.1039/D1SC02602J>.
- (328) Kim, J.; Myung, N. V.; Hur, H.-G. Peptide Directed Synthesis of Silica Coated Gold Nanocables. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (24), 4366. <https://doi.org/10.1039/c0cc00408a>.
- (329) Munro, C. J.; Knecht, M. R. Solution Effects on Peptide-Mediated Reduction and Stabilization of Au Nanoparticles. *Langmuir* **2017**, *33* (48), 13757–13765. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01896>.
- (330) Baek, M.; DiMaio, F.; Anishchenko, I.; Dauparas, J.; Ovchinnikov, S.; Lee, G. R.; Wang, J.; Cong, Q.; Kinch, L. N.; Schaeffer, R. D.; Millán, C.; Park, H.; Adams, C.; Glassman, C. R.; DeGiovanni, A.; Pereira, J. H.; Rodrigues, A. V.; van Dijk, A. A.; Ebrecht, A. C.; Opperman, D. J.; Sagmeister, T.; Buhlheller, C.; Pavkov-Keller, T.; Rathinaswamy, M. K.; Dalwadi, U.; Yip, C. K.; Burke, J. E.; Garcia, K. C.; Grishin, N. V.; Adams, P. D.; Read, R. J.; Baker, D. Accurate Prediction of Protein Structures and Interactions Using a Three-Track Neural Network. *Science* **2021**, *373* (6557), 871–876. <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>.

- (331) Segalman, R. A.; Hexemer, A.; Hayward, R. C.; Kramer, E. J. Ordering and Melting of Block Copolymer Spherical Domains in 2 and 3 Dimensions. *Macromolecules* **2003**, *36* (9), 3272–3288. <https://doi.org/10.1021/ma021367m>.
- (332) Liu, C. C.; Schultz, P. G. Adding New Chemistries to the Genetic Code. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79* (1), 413–444. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.105824>.
- (333) Mehl, R. A.; Anderson, J. C.; Santoro, S. W.; Wang, L.; Martin, A. B.; King, D. S.; Horn, D. M.; Schultz, P. G. Generation of a Bacterium with a 21 Amino Acid Genetic Code. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (4), 935–939. <https://doi.org/10.1021/ja0284153>.
- (334) Wang, L.; Zhang, Z.; Brock, A.; Schultz, P. G. Addition of the Keto Functional Group to the Genetic Code of Escherichia Coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (1), 56–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.0234824100>.
- (335) Xiao, H.; Schultz, P. G. At the Interface of Chemical and Biological Synthesis: An Expanded Genetic Code. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8* (9), a023945. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023945>.
- (336) Longo, J.; Yao, C.; Rios, C.; Chau, N. T. T.; Boulmedais, F.; Hemmerlé, J.; Lavalle, P.; Schiller, S. M.; Schaaf, P.; Jierry, L. Reversible Biomechano-Responsive Surface Based on Green Fluorescent Protein Genetically Modified with Unnatural Amino Acids. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (1), 232–235. <https://doi.org/10.1039/C4CC07486F>.
- (337) Hershewe, J. M.; Wiseman, W. D.; Kath, J. E.; Buck, C. C.; Gupta, M. K.; Dennis, P. B.; Naik, R. R.; Jewett, M. C. Characterizing and Controlling Nanoscale Self-Assembly of Suckerin-12. *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9* (12), 3388–3399. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00442>.
- (338) Desai, B. J.; Gonzalez, R. L. Multiplexed Genomic Encoding of Non-Canonical Amino Acids for Labeling Large Complexes. *Nat. Chem. Biol.* **2020**, *16* (10), 1129–1135. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0599-5>.
- (339) Kovalchuk, M. V.; Boikova, A. S.; Dyakova, Yu. A.; Marchenkova, M. A.; Opolchentsev, A. M.; Pisarevsky, Yu. V.; Prosekov, P. A.; Seregin, A. Yu. Modification of the Langmuir–Schaefer Method for Fabrication of Ordered Protein Films. *Crystallogr. Rep.* **2017**, *62* (4), 632–638. <https://doi.org/10.1134/S1063774517040125>.
- (340) Pechkova, E.; Nicolini, C. Langmuir–Blodgett Nanotemplates for Protein Crystallography. *Nat. Protoc.* **2017**, *12* (12), 2570–2589. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.108>.
- (341) Pohanka, M. Glucose Electrochemical Biosensors: The Past and Current Trends. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2021**, ArticleID:210719. <https://doi.org/10.20964/2021.07.52>.
- (342) Juska, V. B.; Pemble, M. E. A Critical Review of Electrochemical Glucose Sensing: Evolution of Biosensor Platforms Based on Advanced Nanosystems. *Sensors* **2020**, *20* (21), 6013. <https://doi.org/10.3390/s20216013>.
- (343) Liu, X.; Huang, D.; Lai, C.; Qin, L.; Zeng, G.; Xu, P.; Li, B.; Yi, H.; Zhang, M. Peroxidase-Like Activity of Smart Nanomaterials and Their Advanced Application in Colorimetric Glucose Biosensors. *Small* **2019**, *15* (17), 1900133. <https://doi.org/10.1002/smll.201900133>.
- (344) Jiang, C.; Zhu, J.; Li, Z.; Luo, J.; Wang, J.; Sun, Y. Chitosan–Gold Nanoparticles as Peroxidase Mimic and Their Application in Glucose Detection in Serum. *RSC Adv.* **2017**, *7* (70), 44463–44469. <https://doi.org/10.1039/C7RA08967H>.

- (345) Liu, Y. Structural Effects of Amphiphilic Protein/Gold Nanoparticle Hybrid Based Nanozyme on Peroxidase-like Activity and Silver-Mediated Inhibition. *RSC Adv.* **2016**, 10.
- (346) Sun, T. A Colorimetric Method for Determination of the Prostate Specific Antigen Based on Enzyme-Free Cascaded Signal Amplification via Peptide-Copper(II) Nanoparticles. *Microchim Acta* **2020**, 7.
- (347) Li, W.; Chen, B.; Zhang, H.; Sun, Y.; Wang, J.; Zhang, J.; Fu, Y. BSA-Stabilized Pt Nanozyme for Peroxidase Mimetics and Its Application on Colorimetric Detection of Mercury(II) Ions. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 66, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.11.032>.
- (348) He, S.-B.; Chen, R.-T.; Wu, Y.-Y.; Wu, G.-W.; Peng, H.-P.; Liu, A.-L.; Deng, H.-H.; Xia, X.-H.; Chen, W. Improved Enzymatic Assay for Hydrogen Peroxide and Glucose by Exploiting the Enzyme-Mimicking Properties of BSA-Coated Platinum Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2019**, 186 (12), 778. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3939-y>.
- (349) Yao, Z.; Li, Z.; Liu, H.; Liu, Y.; Sun, Y.; Li, Z. Copper Metal–Organic Framework Nanoparticles for Ascorbic Acid Sensing. *Anal. Methods* **2019**, 10.
- (350) Pardoux, E. Détection à large spectre de pathogènes bactériens à l'aide de peptides antimicrobiens. 205.
- (351) Brenet, S.; John-Herpin, A.; Gallat, F.-X.; Musnier, B.; Buhot, A.; Herrier, C.; Rousselle, T.; Livache, T.; Hou, Y. Highly-Selective Optoelectronic Nose Based on Surface Plasmon Resonance Imaging for Sensing Volatile Organic Compounds. *Anal. Chem.* **2018**, 90 (16), 9879–9887. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02036>.
- (352) El Kazzy, M.; Weerakkody, J. S.; Hurot, C.; Mathey, R.; Buhot, A.; Scaramozzino, N.; Hou, Y. An Overview of Artificial Olfaction Systems with a Focus on Surface Plasmon Resonance for the Analysis of Volatile Organic Compounds. *Biosensors* **2021**, 11 (8), 244. <https://doi.org/10.3390/bios11080244>.
- (353) Weerakkody, J. S.; Hurot, C.; Brenet, S.; Mathey, R.; Herrier, C.; Livache, T.; Buhot, A.; Hou, Y. Surface Plasmon Resonance Imaging-Based Optoelectronic Nose: Fundamental Study on the Effects of Temperature and Humidity. In *Optical Sensing and Detection VI*; Berghmans, F., Mignani, A. G., Eds.; SPIE: Online Only, France, 2020; p 44. <https://doi.org/10.1117/12.2555450>.
- (354) Weerakkody, J. S.; Brenet, S.; Livache, T.; Herrier, C.; Hou, Y.; Buhot, A. Optical Index Prism Sensitivity of Surface Plasmon Resonance Imaging in Gas Phase: Experiment versus Theory. *J. Phys. Chem. C* **2020**, 124 (6), 3756–3767. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b09973>.
- (355) Brenet, S.; Weerakkody, J. S.; Buhot, A.; Gallat, F.-X.; Mathey, R.; Leroy, L.; Livache, T.; Herrier, C.; Hou, Y. Improvement of Sensitivity of Surface Plasmon Resonance Imaging for the Gas-Phase Detection of Volatile Organic Compounds. *Talanta* **2020**, 212, 120777. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120777>.
- (356) Kahru, A.; Maloverjan, A.; Sillak, H.; Põllumaa, L. The Toxicity and Fate of Phenolic Pollutants in the Contaminated Soils Associated with the Oil-Shale Industry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2002**, 9 (S1), 27–33. <https://doi.org/10.1007/BF02987422>.

- 
- (357) Dang, C.; Jiranek, V.; Taylor, D. K.; Wilkinson, K. L. Removal of Volatile Phenols From Wine Using Crosslinked Cyclodextrin Polymers. *Molecules* **2020**, *25* (4), 910. <https://doi.org/10.3390/molecules25040910>.
- (358) Kumar, S.; Huang, J.; Abbassi-Ghadi, N.; Španěl, P.; Smith, D.; Hanna, G. B. Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry Analysis of Exhaled Breath for Volatile Organic Compound Profiling of Esophago-Gastric Cancer. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (12), 6121–6128. <https://doi.org/10.1021/ac4010309>.
- (359) Feynman, R. P. Plenty of Room at the Bottom. 7.
- (360) Zhang, L.; Chen, H.; Wei, Z. Recent Advances in Nanoparticles Confined in Two-Dimensional Materials as High-Performance Electrocatalysts for Energy-Conversion Technologies. *ChemCatChem* **2021**, *13* (11), 2541–2558. <https://doi.org/10.1002/cctc.202001260>.



## Résumé :

La nanostructuration de surface aussi appelée *nanopatterning* est un point clé dans les domaines d'applications couvrant la microélectronique, le photovoltaïque ou encore les biocapteurs. Le but de nanostructurer une surface est d'augmenter la surface spécifique pour accroître les performances des appareils. Ceci est permis par la diminution de l'espace (appelé *pitch* en anglais) entre deux motifs adjacents créés par le *nanopatterning* de la surface. Malgré la constante amélioration des techniques de pointe utilisées actuellement pour la création de tels motifs, elles atteignent des limitations physiques et, de surcroît, deviennent très onéreuses. Ces principaux verrous peuvent être levés en utilisant une approche dite *bottom-up* en utilisant des auto-assemblages de molécules. Parmi les molécules présentant des capacités d'auto-assemblage, les protéines se distinguent par leur nature qui les rend intrinsèquement stables et robustes dans des conditions physiologiques. Cependant, les auto-assemblages protéiques décrits dans la littérature sont souvent des monocouches et, de ce fait, présentent peu de site de greffage ce qui limite leur application dans le domaine de la nanotechnologie. Dans ce travail, nous présentons un domaine d'oligomérisation protéique capable de s'auto-assembler, par des interactions tête-queue, créant ainsi une structure en nid d'abeille. Cette structure présente des dimensions en dessous de 10 nm. Nous avons montré qu'il était possible de moduler son ancrage sur différentes surfaces et qu'un pore de ce nid d'abeille était composé de 40 protéines empilées. De plus, il est possible de modifier les acides aminés présents à l'intérieur de ces pores sans modification de la structure en nid d'abeille. Nous avons aussi montré que la fonctionnalisation de cette nanostructure était possible en utilisant des ions métalliques divalents ou trivalents. Ceci ouvre la possibilité d'utiliser cette structure pour des applications dans la nanotechnologie. Dans ce cadre, nous avons évalué l'intérêt de son utilisation dans le cadre de deux types de biocapteurs : un biocapteur colorimétrique pour la détection de glucose et un biocapteur utilisant la résonance des plasmons de surface pour la détection de composés organiques volatiles. Ces résultats montrent le potentiel de ce nid d'abeille protéique pour nanostructurer des surfaces et ainsi améliorer les dispositifs déjà existants.

**Mots-clés :** auto-assemblage, protéines, bio-inspiré, nanotechnologie, biocapteur, greffage

## Abstract :

Surface nanopatterning is a key point in the fields of applications covering microelectronics, photovoltaics or biosensors. The purpose of nanopatterning a surface is to increase the specific surface area to improve the performance of the devices. This is achieved by reducing the pitch between two adjacent motifs created by the nanopatterning. Despite the constant improvement of the state-of-the-art techniques currently used for the creation of such patterns, they reach physical limitations and become very expensive. These main limitations can be overcome with bottom-up approach using self-assembling molecules. Among the molecules with self-assembly capabilities, proteins are distinguished by their nature, which makes them intrinsically stable and robust under physiological conditions. However, the protein self-assemblies described in the literature are often monolayers and, therefore, present few grafting sites, which limits their application in the field of nanotechnology. In this work, we present a protein oligomerization domain capable of self-assembly, through head-tail interactions, creating a honeycomb structure. This structure presents dimensions below 10 nm. We showed that it was possible to modulate its anchor on different surfaces and that one pore of this honeycomb was composed of 40 stacked proteins. Moreover, it is possible to modify the amino acids present inside these pores without modifying the honeycomb structure. We also showed that the functionalization of this nanostructure was possible using divalent or trivalent metal ions. This opens the possibility of using this structure for applications in nanotechnology. In this context, we have evaluated the interest of its use in two types of biosensors: a colorimetric biosensor for glucose detection and a biosensor using surface plasmon resonance for the detection of volatile organic compounds. These results show the potential of this protein honeycomb to nanostructure surfaces and thus improve already existing devices.

**Keywords :** self-assembly, protein, bio-inspired, nanotechnology, biosensor, grafting