

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivant**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Anaëlle RONGIER

Thèse dirigée par **Vincent FORGE** et **Patrice RANNOU**

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux** et
du **Laboratoire Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour
l'Energie et la Santé**

dans l'**École Doctorale de Physique de Grenoble**

Auto-assemblage de protéines pour la bioélectronique : Etude du transport de charges dans les fibres amyloïdes

Thèse soutenue publiquement le **13 février 2018**, devant le jury
composé de :

Mr Franz BRUCKERT

Professeur, Grenoble INP, Président

Mme Arianna FILORAMO

Directrice de recherche CEA, CEA Saclay, Rapporteur

Mr Benoît LIMOGES

Directeur de recherche CNRS, Université Paris-Diderot, Rapporteur

Mr Giorgio SCHIRO

Chargé de recherche CNRS, IBS Grenoble, Examineur



Résumé

Les fibres amyloïdes sont des biomatériaux prometteurs pour la bio(nano)électronique, en particulier pour l'interfaçage avec les systèmes biologiques. Ces fibres, formées par l'auto-assemblage de protéines, sont aisément synthétisables et modifiables/fonctionnalisables. Elles possèdent de surcroît des propriétés physiques remarquables notamment en termes de stabilité et de résistance mécanique. Nous avons étudié les mécanismes de transport de charges dans les fibres formées par le domaine prion de la protéine HET-s : HET-s(218-289), dont la structure atomique sous la forme de fibres est connue. Les échantillons ont été caractérisés électriquement et électrochimiquement sous la forme de films "secs". L'influence de plusieurs paramètres sur leur conductivité a été étudiée : température, humidité ou encore la lumière. Nous avons montré que l'organisation de la protéine en fibres autorise un processus de transport de charges intrinsèques. De plus, l'eau joue un rôle essentiel dans ces mécanismes : les principaux porteurs de charges sont certainement des protons. En parallèle, une simulation de dynamique moléculaire appuyée par les résultats de caractérisations par diffusion des neutrons, a mis en évidence une forte interaction entre l'eau et les fibres. Deux canaux d'eau stabilisés par liaisons hydrogènes se formeraient le long des fibres. Ces derniers peuvent permettre le transport de protons par un mécanisme de type Grotthuss. Des réactions électrochimiques, en particulier l'électrolyse de l'eau, seraient la source des protons transportés grâce aux fibres. Cela conduit à l'instauration d'un courant d'oxydoréduction à partir d'un seuil de tension de polarisation. Enfin, deux effets photo-électriques ont été observés lorsque les fibres sont irradiées entre 200 et 400 nm. Le premier est un photocourant qui serait dû à la photolyse de l'eau adsorbée dans les échantillons. Le second, qualifié de "photo-courant inverse", se produit plus spécifiquement à la longueur d'onde de 280nm et seulement en présence de dioxygène. Il engendre une diminution de la conductivité. Cela serait dû à une réaction entre l'état triplet des tryptophanes des fibres et le dioxygène produisant des espèces réactives de l'oxygène qui, à leur tour, captent des protons.

Abstract

Amyloid fibers are promising biomaterials for bio(nano)electronics, especially for interfacing with biological systems. These self-assembled protein fibers are easy to synthesize, to tune and to functionalize. Their physical properties such as stability and mechanical strength are noticeable. We studied charge transport processes in HET-s(218-289), an amyloid fibers with a known atomic structure. The samples were electrically and electrochemically characterized as "dried" films. The influence of several parameters such as temperature, humidity or light was investigated. We demonstrated that the fiber organization allows intrinsic charge transport mechanisms in which water plays a crucial role. Furthermore, the dominant charge carriers are most certainly protons. Molecular dynamic simulation and neutron scattering experiments run in parallel show strong water-fiber interactions. In particular, H-bonded water channels can be formed along the fibers and support proton transport according to a Grotthuss-like mechanism. Proton production would result from electrochemical reactions, especially from water electrolysis, occurring on electrode surfaces. Therefore a catalytic current is detected when the bias exceeds a certain threshold. In addition, two photoelectric phenomena were observed when the fibers are irradiated with near UV light (200-400nm). The first one is a photocurrent most probably related to water photo-splitting. The other occurs specifically at the 280nm wavelength and in the presence of molecular oxygen. It leads to a so-called "inverse photoconductance" phenomena. This likely results from chemical reaction between triplet-state tryptophan and oxygen that produces reactive oxygen species which in turn consume protons.

Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu mes encadrants, les docteurs Vincent Forge et Patrice Rannou, qui m'ont guidé avec bienveillance pendant ces trois ans de thèse et avec qui j'ai eu un réel plaisir à travailler.

Toute ma gratitude va également au Dr. Arianna Filoramo et au Dr. Benoît Limoges qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit, ainsi qu'au Dr. Giorgio Schiro et au Dr. Franz Bruckert qui les ont accompagnés le jour de ma soutenance en qualité d'examineurs de mon jury de thèse.

J'exprime un grand merci à tous les membres de l'équipe AFFOND, qui m'ont accompagné pendant ces trois ans Christel, Lucas, Nicolas, Carole ou pendant un petit bout de chemin Saro, Babeth, Justine, Maxime, Sunjae. Vous m'avez offert un environnement de travail chaleureux. Je remercie particulièrement Lucie qui m'a formé et initié à mon sujet de thèse les premiers mois de mon arrivée au laboratoire ainsi que Jonathan avec qui j'ai partagé le bureau et la vie de thésards.

Je salue sincèrement les personnes qui ont grandement contribué à ce travail : les Dr. Trévor Forsyth, Bruno Demé et Estelle Mossou pour leur grande disponibilité et qui nous ont permis de réaliser les expériences de diffusion des neutrons à l'ILL, le Dr. Serge Crouzy de l'équipe modélisation et chimie théorique pour son étude décisive de modélisation moléculaire, le Dr. Chantal Gondran qui a comblé nos nombreuses lacunes en spectroscopie d'impédance électrochimique, Tomas Dane pour ses expériences de diffusion des rayons-X à l'ESRF ainsi qu'Adina Morozan de l'équipe Solhycat pour les expériences de spectroscopie en phase gazeuse. Merci également à Aurélie Thuaire, Patrick Reynaud et bien sûr Corentin avec qui nous avons longuement collaboré même si nous n'avons pas obtenu les résultats espérés.

Merci au Dr. Stéphane Ménage qui m'a accueilli au sein du laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux ainsi qu'à l'ensemble des membres du labo LCBM où j'ai réalisé l'essentiel de mes travaux. Merci particulièrement à mes collègues thésards avec qui nous avons échangé sur les joies et les peines de notre vie de thésard.

Enfin je remercie chaleureusement ma famille, mes amis et mon compagnon de tous les jours pour leur grand soutien et sans qui je n'aurais pas pu en arriver là.

Table des matières

RÉSUMÉ.....	- 3 -
REMERCIEMENTS.....	- 3 -
TABLE DES MATIÈRES	- 7 -
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	- 11 -
AVANT-PROPOS	- 14 -
A - INTRODUCTION GÉNÉRALE	- 13 -
I- L'essor de la bioélectronique	- 19 -
I.1. Les principaux domaines d'application en bioélectronique.....	- 20 -
I.1.2. Les interfaces machine/vivant.....	- 21 -
I.1.3. La bio-informatique	- 22 -
I.1.4. Les bio-piles	- 24 -
I.2. Les enjeux de l'interfaçage électronique/biologie.....	- 25 -
I.3. L'électronique organique	- 28 -
I.3.1. Polymères semi-conducteurs et conducteurs électroniques	- 28 -
I.3.2. Polymères conducteurs mixtes électroniques et ioniques	- 30 -
I.3.3. Cas de la conduction protonique et le mécanisme de Grotthuss	- 31 -
II- ELECTRONIQUE ET MATERIAUX BIOLOGIQUES.....	- 34 -
II.1. Le transfert de charge dans les protéines	- 34 -
II.1.1. Le transfert d'électrons	- 35 -
II.1.2. La conduction ionique et protonique	- 37 -
II.1.2. i) Cas particulier de la conduction protonique	- 38 -
II.1.3. Réactions de transfert couplé d'électron(s) et de proton(s) (PCET).....	- 39 -
II.2. Le transport intermoléculaire	- 41 -
II.2.1. La caractérisation électrique des matériaux biologiques	- 41 -
II.2.2. Transport d'électrons	- 41 -
II.2.2 i) Rôle des structures aromatiques : Empilement π par Interaction de van der Waals (π - π stacking).....	- 42 -
II.2.3. Importance du rôle de l'eau	- 43 -
II.2.3. i) Théorie de la percolation	- 43 -
II.3. Les matériaux semi-conducteurs biologiques	- 44 -
II.3.1. Les pilis et nano-fils bactériens, conducteurs naturels.....	- 44 -
II.3.2. Protéines et autres matériaux biologiques	- 45 -
II.3.3. Les fibres amyloïdes	- 46 -
III- LES FIBRES AMYLOÏDES.....	- 50 -
III.1. Formation et structure	- 50 -
III.2. Propriétés des fibres amyloïdes.....	- 53 -
III.2.1. Propriétés générales et intérêt pour les biotechnologies.....	- 53 -
III.2.2. Focus sur l'utilisation des fibres amyloïdes pour la bioélectronique	- 55 -
III.3. La Protéine amyloïde HET-s(218-289)	- 58 -
III.3.1. Présentation générale.....	- 58 -
III.3.3. Structure de HET-s(218-289) au regard du transport de charges.....	- 60 -
B - MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	- 59 -
I- PRODUCTION DES ECHANTILLONS DE PROTEINE	- 64 -
I.1. Production de la protéine recombinante HET-s(218-289).....	- 64 -

I.1.1. Expression et purification de HET	- 64 -
I.1.1. i) Transformation et culture bactérienne.....	- 65 -
I.1.1. ii) Extraction et purification.....	- 65 -
I.1.2. Dialyse, organisation supramoléculaire de la protéine.....	- 66 -
II- ETUDE DU TRANSPORT DE CHARGES DANS LES FIBRES AMYLOÏDES HET	- 68 -
II.1. <i>Caractérisation électrique</i>	- 68 -
II.1.1. Méthode de mesure deux pointes.....	- 68 -
II.2. Caractérisation par spectrométrie d'impédance électrochimique (EIS)	- 70 -
III- ETUDE DE LA STRUCTURE DES ECHANTILLONS	- 71 -
III.1. <i>Techniques d'imagerie TEM et AFM</i>	- 71 -
III.1.1 La Microscopie Electronique en Transmission	- 71 -
III.1.2. La Microscopie à Force Atomique	- 72 -
III.2. <i>Etude la structure de fibres HET : Diffusion des rayons X et des neutrons</i>	- 74 -
III.2.1. Principe de base.....	- 74 -
III.2.2. Préparation des échantillons de fibres HET pour la diffusion/diffraction des rayons-X et des neutrons	- 75 -
III.2.2. i) La diffusion des rayons X.....	- 76 -
III.2.2. ii) La diffusion des neutrons	- 76 -
C - RÉSULTATS & DISCUSSIONS	- 75 -
I- CARACTERISATION ELECTRIQUE ET ELECTROCHIMIQUE DES FIBRES HET	- 80 -
I.1. <i>Caractéristiques courant-tension (I-V) : effet de l'organisation en fibres</i>	- 80 -
I.1.1. Conduction électronique... ?	- 83 -
I.1.2. ...ou protonique ?.....	- 84 -
I.1.3. Difficile distinction entre conductions électronique et protonique	- 86 -
I.2. <i>Rôle prédominant de l'eau sur la conductivité</i>	- 89 -
I.2.1. Effet de l'humidité sur la conductivité des fibres et monomères HET	- 89 -
I.2.1. i) Effet de l'humidité : I-t.....	- 89 -
I.2.1. ii) Effet de l'humidité : I-V	- 91 -
I.2.1. iii) Hypothèse sur le type de porteur de charges.....	- 93 -
I.2.2. Effet de la température sur la conductivité des fibres et monomères HET	- 93 -
I.3. <i>Production électrochimique de protons</i>	- 95 -
I.3.1. Effet de l'oxygène sur la conduction : I-V	- 96 -
I.3.2. Production d'hydrogène.....	- 98 -
I.3.3. Catalyse de la dissociation de l'eau ?.....	- 101 -
I.4. <i>Conclusion</i>	- 104 -
II- ETUDE DE L'INTERACTION EAU-FIBRES HET	- 106 -
II.1. <i>Etude de l'interaction eau-fibre : simulation de dynamique moléculaire</i>	- 106 -
II.2. <i>Etude expérimentale de l'interaction eau-fibre</i>	- 109 -
II.2.1. Isotherme d'adsorption d'eau des fibres HET	- 109 -
II.2.2. diffusion des RX et des neutrons	- 110 -
II.2.2. i) Diffusion des rayons X aux petits et grands angles: principales caractéristiques structurales des fibres HET	- 110 -
II.2.2. ii) Etude de l'interaction eau-fibres par diffusion des neutrons	- 112 -
II.3. <i>Mécanisme(s) de transport de protons</i>	- 116 -
II.3.1. Effets de l'adsorption d'eau : Spectroscopie d'Impédance Electrochimique	- 116 -
II.3.2. Reconsidération de l'effet de l'humidité sur la conductivité des fibres HET	- 120 -
II.3.3. Effet du pH sur la conductivité des films de fibres HET	- 122 -
II.4. <i>Conclusion</i>	- 125 -
III- EFFETS DE LA LUMIERE SUR LA CONDUCTIVITE DES FIBRES HET	- 126 -
III.1. <i>Effets de la longueur d'onde d'irradiation</i>	- 127 -

III.1.1. Balayage en longueur d'onde	127 -
III.1.2. Effet de la longueur d'onde 280 nm	130 -
III.1.2. i) Caractéristique I-V	130 -
III.1.2. ii) Mesures I-t.....	131 -
III.1.3. Etat de l'art sur la photo-injection de porteurs de charge.....	133 -
III.1.4. Dépendances en fonction de la puissance d'illumination.....	134 -
III.2. <i>Effet de l'oxygène et effet de la lumière</i>	135 -
III.3. <i>Rôle des résidus aromatiques</i>	137 -
III.3.1. La protéine mutée HET-Y281T.....	138 -
III.3.2. Le peptide amyloïde R2T	140 -
III.4. <i>Origine du photo-courant</i>	143 -
III.4.1. Effet de la lumière ($\lambda = 280\text{nm}$) sur la conductivité d'une goutte de solution HCl 100 μM	143 -
III.4.2. Hypothèses sur les mécanismes de génération des photo-courants.....	144 -
III.4.2. i) Origine du photo-courant positif	144 -
III.4.2. ii) Origine du « photo-courant » négatif	146 -
III.5. <i>Conclusion</i>	148 -
D - CONCLUSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES	145 -
ANNEXE	151 -
BIBLIOGRAPHIE	151 -

Liste des abréviations

(O)FET	transistor à effet de champ (organique)
(O)LED	diode électroluminescente (organique)
μ	mobilité des porteurs de charge ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
AcAc	acide acétique : CH_3COOH
ADN	acide désoxyribonucléique
AFM	microscopie à force atomique
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
CD	dichroïsme circulaire
DDP	différence de potentiel (V)
DO_{600}	densité optique à 600 nm
E_a	énergie d'activation (eV)
EIS	spectrométrie d'impédance électrochimique
ExPASy	serveur de l'institut suisse de bioinformatique (Expert Protein Analysis System)
FF	peptide diphenylalanine
GC	carbone vitreux
GuHCl	guanidine hydrochloride
HET	protéine HET-s(218-289)-His ₆
HET-s(218-289)	domaine prion de la protéine HET-s
HOMO	orbitale moléculaire la plus haute occupée
I	intensité de courant (A)
IMDZ	imidazole
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
k_b	constante de Boltzmann $k_b \approx 8,617 \times 10^{-5} \text{ eV} \cdot \text{K}^{-1}$
LB	bouillon lysogène (milieu de culture nutritif pour la culture bactérienne)
liaison-H	liaison hydrogène
LUMO	orbitale moléculaire la plus basse inoccupée
Mw	Masse moléculaire
OECT	transistor électrochimique organique
OEIP	pompe ionique organique
PBS	tampon phosphate salin
PEDOT	poly(3,4-éthylènedioxythiophène)
PFT	mode d'AFM à contact intermittent
pI	point isoélectrique
PSS	poly(styrène sulfonate)
R	résistance électrique (Ω)
Rd	protéine rubrédoxine
Rd-HET	protéine de fusion entre la protéine rubrédoxine et le domaine prion de la protéine HET-s

HR	humidité relative
RMN	résonnance magnétique nucléaire
RX	rayons X
SANS	diffusion des neutrons aux petits angles
SAXS	diffusion des rayons X aux petits angles
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide avec dodécysulfate de sodium
SMU	unité de source et de mesure
t	temps
<i>T</i>	température
TEM	microscopie électronique en transmission
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	ultraviolet
V	tension/potentiel électrique (V)
Z	impédance (Ω)
ϵ	coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$)
λ	longueur d'onde (nm)
C	capacité électrique (F)
PDB	Protein Data Bank
rmsd	root mean square deviation
SGA	analyseur gravimétrique de sorption
<i>f</i>	fréquence (Hz)
PCET	transfert couplé d'électron et de proton
ET	transfert d'électron
PT	transfert de proton

Avant-propos

Le transport de charge en biologie est fondamental pour de nombreux processus métaboliques vitaux des organismes vivants tels que la production, le stockage ou l'utilisation d'énergie. Ces mécanismes de transport sont principalement assurés par des protéines qui permettent le transport intra et intermoléculaire d'électrons, de protons ou d'autres ions. Des travaux antérieurs au sein de l'équipe ont montré qu'une conduction électrique était possible au sein des fibres amyloïdes formées par le domaine prion de la protéine HET-s (HET-s(218-289)). Les structures amyloïdes, formée par auto-assemblage de sous-unités protéiques, présentent des propriétés extrêmement avantageuses pour des applications en biotechnologies et en bioélectronique en particulier. Etudier leurs caractéristiques électriques pour comprendre et maîtriser les mécanismes de transport dont ils sont le siège revêt ainsi une importance primordiale.

La connaissance de la structure de la protéine HET-s(218-289) sous la forme de fibres amyloïde (résolue par RMN du solide) est un atout considérable pour l'étude et la compréhension des processus responsables du transport de charges. C'est pourquoi cette protéine a initialement été choisie comme objet d'étude. Après les travaux des Dr. Christophe Horvath et Dr. Lucie Altamura qui se sont notamment intéressés à cette protéine, les protocoles permettant la préparation d'échantillons homogènes constitué de protéines HET-s(218-289) organisées sous forme de fibres ou non (forme monomère) sont bien établis. Les travaux de cette thèse s'inscrivent donc dans la poursuite de la caractérisation électrique de ces matériaux biologiques initiée par le Dr. Altamura.

Nous proposons une stratégie consistant à coupler cette caractérisation électrique et électrochimique avec l'étude de la structure des fibres HET-s(218-289). Cette dernière est indispensable puisque les propriétés électriques des matériaux sont intrinsèquement liées à leur structure. De plus, une attention particulière a été portée sur l'impact de l'eau sur la structure des fibres. Nos travaux multidisciplinaires ont bénéficié de plusieurs collaborations. Concernant les caractérisations électrochimiques, le Dr. Adina Morozan (UMR5249-LCBM) a rendu possible la détection de gaz formés lors des mesures électriques et le Dr. Chantal Gondran (UMR5250-DCM) nous a apporté un aide précieuse pour l'interprétation des expériences de spectroscopie d'impédance électrochimique. Les simulations de dynamique moléculaire réalisées par le Dr. Serge Crouzy (UMR5249-LCBM) et les isothermes de sorption des échantillons mesurés avec l'aide du Pr. Laurent Gonon (UMR5819-SyMMES) ont apportés de informations cruciales sur l'interaction de l'eau avec les fibres HET-s(218-289). Les images d'AFM de films de protéines ont été réalisées en collaboration avec Denis Mariolle (CEA-LETI). Pour continuer avec l'étude structurale des échantillons, les fibres HET-s(218-289) ont été analysées par diffusion des rayons-X par le Dr. Thomas Dane à l'ESRF ainsi que par diffusion des neutrons à l'ILL sous le contrôle du Pr. Trevor Forsyth (ILL) et des Dr. Estelle (ILL) Mossou et Dr. Bruno Demé (ILL).

Ce manuscrit est structuré de la manière suivante. Tout d'abord l'introduction générale présente un état de l'art sur les enjeux de la bioélectronique ainsi que sur le transport de charges en biologie. Une attention particulière est portée sur les matériaux biologiques étudiés en tant que matériaux (semi-)conducteurs, avec un focus particulier sur les fibres amyloïdes. Une présentation des fibres amyloïdes et de la protéine HET-s(218-289) est également proposée dans cette partie. Après une section consacrée aux principales techniques et méthodes d'expérimentations utilisées au cours de ces travaux, les résultats en seront présentés dans un dernier chapitre organisé en trois parties. La première sera consacrée à la caractérisation électrique des fibres amyloïdes HET-s(218-289). On s'y attache en particulier à déterminer la nature des porteurs de charges responsables des propriétés conductrices de ce matériau. L'étude de la structure des fibres et de leurs interactions avec l'eau présentée dans une deuxième section vient compléter les résultats précédents et permet de consolider les hypothèses se rapportant aux mécanismes de transport de charge dans ces fibres. Enfin, la dernière partie se focalise sur les effets photoélectriques originaux mise en évidence dans ces matériaux.

Introduction Générale

I- L'essor de la bioélectronique

Forts de milliers d'années d'évolution et de sélection naturelle, les systèmes biologiques sont capables de réaliser efficacement des fonctions extrêmement variées et complexes. Ceux-ci s'appuient sur un vaste arsenal de molécules telles que les enzymes, l'ADN/ARN, les pompes et canaux ioniques, les moteurs moléculaires, etc... . L'idée d'associer les impressionnantes capacités développées par la nature avec des technologies élaborées par l'homme pour parvenir à de nouvelles fonctionnalités est ancienne¹. Depuis la seconde moitié du XX^{ème} siècle, les avancées technologiques et techniques en biophysique et biologie moléculaire ont permis un véritable bond en avant quant à l'étude structurale et fonctionnelle de ces "machines" biologiques. Dans le même temps, la progression spectaculaire des systèmes et dispositifs électroniques basé sur l'exploitation des propriétés (opto)électronique de certains matériaux semi-conducteurs, dont le silicium en premier lieu, supporte un grand pan de l'innovation technologique des 70 dernières années. L'augmentation de la complexité des microprocesseurs et la miniaturisation des transistors et d'autres de leurs composants élémentaires, permettent l'accroissement des capacités et performances de dispositifs électroniques toujours plus nombreux et variés, tout en réduisant sans cesse leurs dimensions.

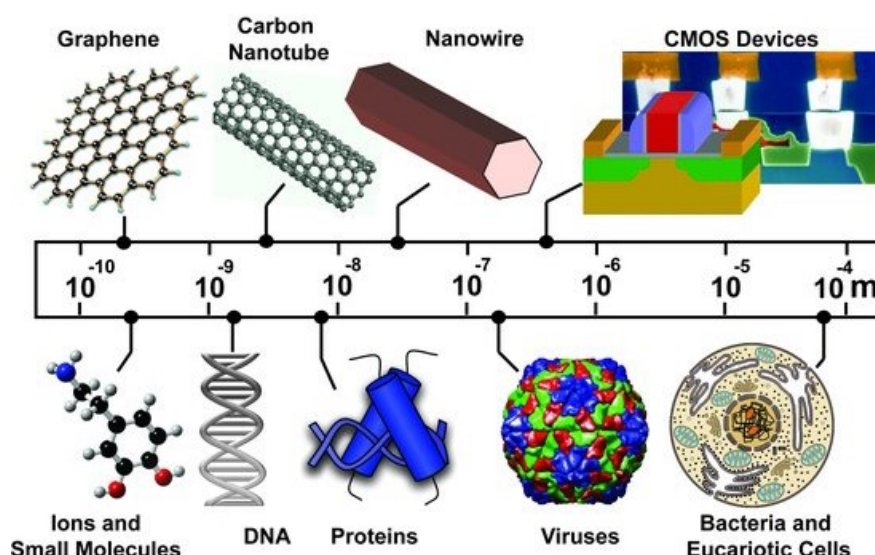


Figure A.1 : Comparaison des tailles typiques entre quelques objets biologiques et composants de l'électronique conventionnelle. Les progrès réalisés en micro et nanoélectronique depuis la fin des années 1990 permet l'utilisation de composés de dimensions équivalentes à celles des principaux composants de base du vivant. Par exemple, les nanotubes de carbone les plus fins peuvent atteindre un diamètre de 1 nm, ce qui est comparable à celui de l'ADN double brin (*c.a.* 2nm) ou encore des fibres amyloïdes HET-s(218-289) (*c.a.* 6nm), objets d'étude de cette thèse.

Tiré de Noy A.¹

Au tournant des années 2000, la taille des transistors descend en dessous de la centaine de nanomètres jusqu'à atteindre une quinzaine de nanomètres aujourd'hui. L'avènement de ces nanotechnologies aux propriétés physiques si particulières, inhérentes à leur dimension, et les progrès réalisés en électronique organique, employant des matériaux plus biocompatibles, ouvrent la porte à de nouvelles opportunités². Le domaine de la bioélectronique est particulièrement concerné puisque l'échelle des molécules biologiques est désormais accessible (**Figure A.1**). De ce fait, le développement de la bioélectronique s'accélère dans ses principaux champs d'application³.

I.1. Les principaux domaines d'application en bioélectronique

I.1.1. Les biocapteurs

Le secteur concentrant la majeure partie de l'activité et sûrement le plus avancé concerne le développement de bio-récepteurs et biocapteurs. Ces capteurs de très petite taille sont composés d'un ou plusieurs composants biologiques intégré(s) à un système physique ou physico-chimique de haute sensibilité capable d'assurer la transduction des signaux d'origine biologique, souvent faibles, en signaux électriques pouvant être interprétés par les dispositifs électroniques conventionnels^{3,4} (**Figure A.2**). De multiples molécules peuvent être utilisées comme des enzymes qui sont certainement les catalyseurs de réactions chimiques couplant efficacité et sélectivité de la manière la plus remarquable, des antigènes/anticorps, des sucres, des lipides, des protéines réceptrices ou des fragments d'ADN/ARN capables de reconnaître et de se lier spécifiquement à des molécules cibles, ou encore des cellules entières et des tissus, sensibles à leur environnement extérieur de manière plus globale.

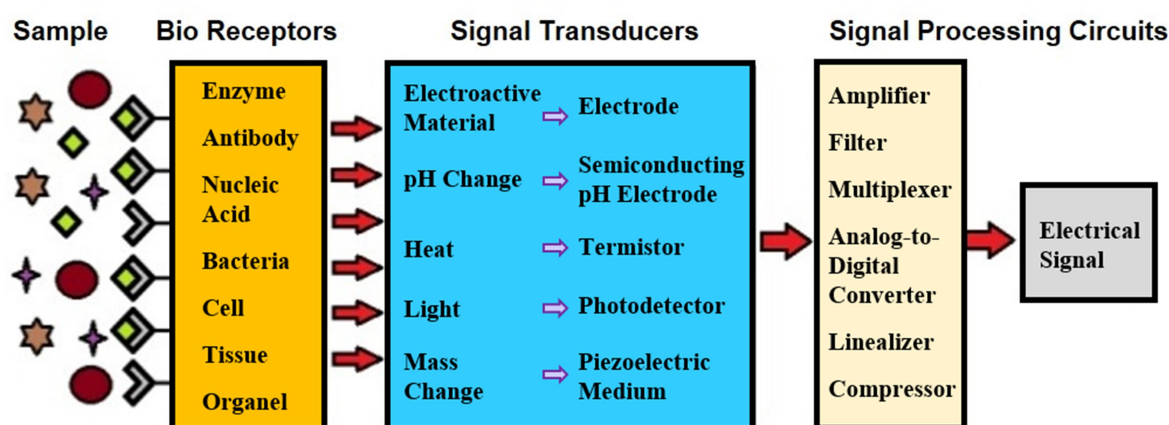


Figure A.2 : Schéma du principe de fonctionnement des biocapteurs

Adapté de : <http://www.intechopen.com/source/html/37959/media/image9.png>

Ainsi ces dispositifs permettent l'analyse rapide, fiable et la plupart du temps quantitative d'une grande variété de molécules d'intérêt. Ils trouvent de nombreuses applications dans les

domaines du biomédical (diagnostique, suivi de paramètres physiologiques, médecine personnalisée), de l'agroalimentaire et de la pharmacologie (suivi des procédés de fabrication, criblage) ou de l'environnement (contrôle de la qualité de l'eau, de l'air).

L'exemple historique est le biocapteur à glucose, dérivé des électrodes à enzyme pour la détection de l'oxygène développées par Clark et Lyons en 1962⁵. Il consiste en le piégeage de l'enzyme glucose oxydase à la surface d'une électrode électrochimique grâce à une membrane de dialyse perméable à l'oxygène. Le glucose contenu dans l'échantillon à analyser est dégradé en gluconolactone par une réaction catalysée par la glucose oxydase consommant une molécule d'O₂. La cellule électrochimique, siège de la réduction de l'oxygène, est sensible à la concentration en O₂ et fournit *in fine* un courant inversement proportionnel à la concentration en glucose de l'échantillon. Ce modèle a été perfectionné et adapté à maintes reprises pour aboutir à des dispositifs capables de détecter le glucose ou d'autres molécules dans des échantillons de volume de plus en plus réduits comme une goutte de sang. Les progrès accomplis plus récemment ont permis la mise au point dans les années 2000 des premiers biocapteurs implantables *in vivo* chez l'homme et l'animal, principalement pour le suivi et le contrôle de la glycémie ou la détection de neurotransmetteurs dans le domaine des neurosciences⁶. L'engouement pour ces dispositifs est fort, les biocapteurs implantables notamment sont perçus comme étant l'avenir du diagnostic et du suivi des patients. Cependant, parmi les nombreux types de biocapteurs existants aujourd'hui, seule une petite minorité s'acquitte des multiples exigences requises en termes de biocompatibilité, toxicité, stabilité etc..., afin de pouvoir être implanté *in vivo*⁶.

1.1.2. Les interfaces machine/vivant

Ce problème d'interfaçage et de compatibilité avec le vivant est également le principal obstacle rencontré par les techniques d'interfaçage "cerveau-machine"^{3,1}, discipline en très forte expansion depuis les années 1990. Celle-ci vise la conception d'interfaces de communication uni- ou bidirectionnelles entre le système nerveux ou d'autres tissus électriquement excitable, et un dispositif externe (un ordinateur ou autre processeur) dans le but de rétablir ou d'améliorer certaines fonctions physiologiques. Un des principaux défis est d'assurer la propagation des signaux entre les systèmes biologiques fonctionnant par impulsions électriques résultantes de flux d'espèces ionique, et des dispositifs artificiels reposant sur des flux d'électrons.

Deuxièmement, les neurostimulateurs pour les nouvelles thérapies basées sur la stimulation cérébrale profonde qui montrent des résultats encourageants pour le traitement de certaines pathologies neuropsychiatriques et troubles moteurs comme la maladie de Parkinson, les dystonies, des douleurs chroniques ou encore des dépressions graves⁷. Ce type de traitement consiste à modifier l'activité cérébrale du patient de manière contrôlée et réversible via la stimulation directe de groupes spécifiques de neurones par impulsions électriques. Néanmoins, de nombreuses inconnues subsistent quant à la compréhension des mécanismes de fonctionnement de cette technique et le mode opératoire pour le patient est lourd, pouvant

entraîner des complications et des effets secondaires graves, c'est pourquoi elle n'est pour le moment utilisée qu'en dernier recours.

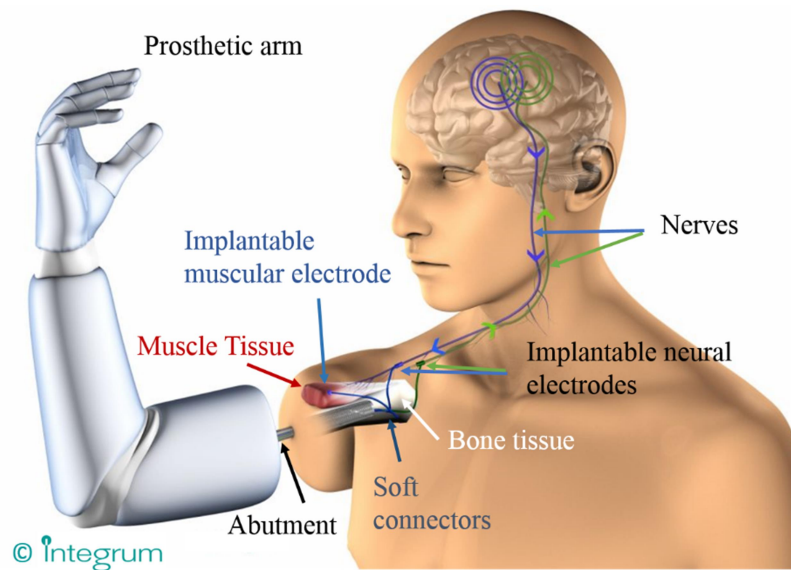


Figure A.3 : Schéma de la connexion d'une prothèse de bras bionique au système nerveux humain

De nombreux progrès ont été réalisés depuis la pose des premiers pacemakers implantables dédiés à la stimulation des muscles cardiaques dans les années 1960. Aujourd'hui, les efforts sont portés principalement sur les interfaces neuronales pour deux types d'applications : premièrement les neuroprothèses et implants⁸ reliés voire contrôlés par le système nerveux pour la restauration de facultés défaillantes comme la vue⁹ ou l'ouïe¹⁰ et même des mouvements simples (**Figure A.3**). De plus, et non sans poser de problèmes d'éthique, elles rendent possible l'extension de ces facultés au-delà des capacités humaines naturelles.

Enfin, ces technologies homme-machine restent extrêmement coûteuses, difficiles à mettre en place et à entretenir. Des améliorations sont recherchées à la fois dans la compréhension du fonctionnement du cerveau pour permettre une meilleure maîtrise de ces techniques, ainsi que dans l'optimisation des interfaces neuronales visant à gagner en précision, en autonomie énergétique ou encore en miniaturisation et stabilité.

1.1.3. La bio-informatique

Un troisième domaine à fort potentiel est la bio-informatique. En effet, le développement de "bio-ordinateurs" est une des alternatives réalistes, avec les ordinateurs quantiques, pour répondre au fait que l'on se rapproche de plus en plus des limites de performance et de miniaturisation des composés issus de l'électronique traditionnelle. Ici, les fonctions de base d'un ordinateur : le stockage de l'information, la transmission de données et la réalisation de fonctions logiques sont réalisées par des molécules biologiques, en particulier des protéines et l'ADN¹¹. L'ADN, porteur de l'information génétique du vivant, est particulièrement adapté pour le stockage de données, notamment à long terme. Il possède des qualités de compacité extraordinaire avec une densité volumique de stockage un million de fois plus élevée que celle

d'un disque dur, couplé à une durée de vie exceptionnelle : elle pourrait atteindre plusieurs millions d'années en prenant des dispositions de conservation appropriées. De nombreux acteurs académiques et industriels s'y intéressent, Microsoft et la start-up Twist Bioscience ont notamment annoncé en 2016 avoir réussi à encoder 200Mo d'information sous forme de molécules d'ADN de synthèse puis à les lire de manière sélective (données non publiées). Les techniques de séquençage à haut débit et de synthèse d'ADN à grande échelle progressent constamment en termes de quantité de données stockées, de vitesse, ou encore de limitation d'erreurs d'encodage et de lecture, tandis que le coût de ces techniques décroît d'années en années. Ceci autorise à penser que cette technologie pourrait prochainement être effectivement utilisée.

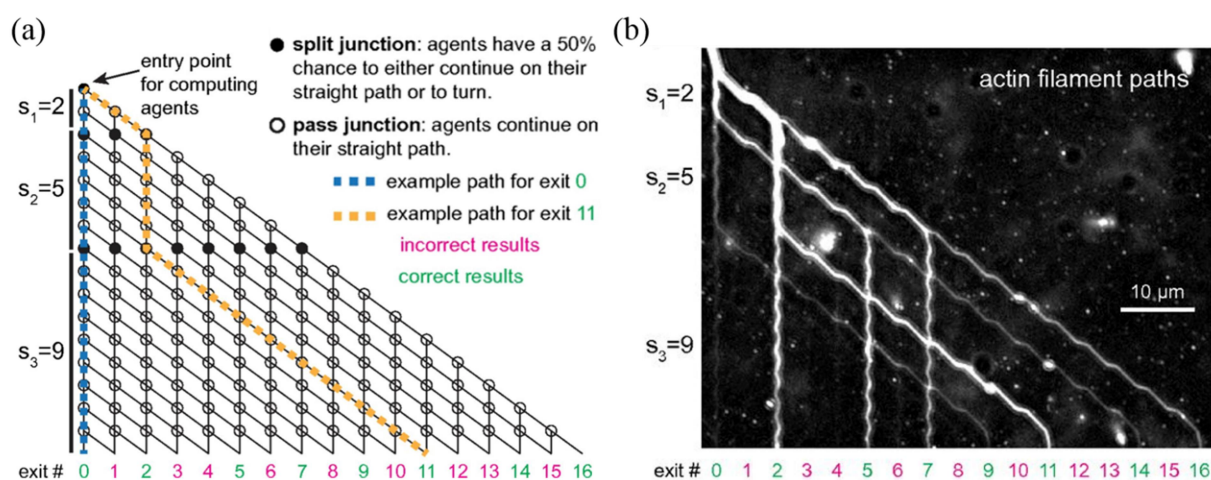


Figure A.4 : (a) Représentation schématique du réseau de nanotubes permettant de résoudre un problème de la somme de sous-ensembles (PSS) défini par l'ensemble $\{2, 5, 9\}$. Les agents circulants dans le réseau (des filaments d'actine ou des microtubules) sont introduits par le haut et ressortent par le bas en donnant une solution possible du PSS (chiffres verts). Au sein du réseau, les jonctions de séparation (cercles pleins), autorisant les agents à tourner avec 50 % de chance, possèdent une géométrie différente des jonctions simples (cercles vides) n'autorisant pas de changement de direction. Finalement, les agents circulants empruntent obligatoirement un chemin menant vers une solution du problème. (b) Image de microscopie de fluorescence montrant la circulation de filaments d'actine dans le réseau de résolution du PSS $\{2, 5, 9\}$.

Tiré de Nicolau D.V. Jr. *et al.*¹²

En ce qui concerne la réalisation d'opérations de calculs et de traitement de données, ce sont plutôt les protéines et les cellules qui sont préférées. En effet, ces molécules sont extrêmement sensibles aux nombreux signaux de leur environnement et y répondent de manière spécifique par différentes voies et processus chimiques. Différentes solutions sont envisagées. Par exemple des équipes ont réussi à "programmer" des cellules vivantes à répondre à des signaux d'entrée chimiques particuliers¹³. D'autres ont implémenté un système biologique capable de résoudre un type de problème combinatoire plus efficacement que les ordinateurs classiques en faisant circuler des filaments d'actines et des microtubules dans un réseau de nanotubes grâce à des moteurs moléculaires, respectivement la myosine et la kinésine, et fonctionnant avec de l'ATP comme unique source d'énergie¹² (**Figure A.4**). La prochaine étape serait la diversification des tâches pouvant être accomplies par des processeurs biologique et leur

association avec les ordinateurs conventionnels dans le but d'améliorer les performances de ces derniers.

1.1.4. Les bio-piles

Le développement de bio-piles enzymatiques ou microbiennes pour la production d'énergie électrique à partir de combustibles renouvelables est également un secteur de recherche important. Celles-ci fonctionnent selon le même principe que les piles à combustible classiques produisant un courant d'électrons issu des réactions d'oxydation siégeant à l'anode et de réduction à la cathode³. Le couple redox le plus souvent utilisé étant H_2/O_2 . Dans le cas classique, le dihydrogène est produit à partir d'hydrocarbures fossiles, le dioxygène provient de l'air et les réactions chimiques sont catalysées par des électrodes de platine, métal peu abondant et coûteux. De plus, le platine n'étant pas spécifique d'une réaction, il est nécessaire de séparer les compartiments anodique et cathodique de la pile par une membrane échangeuse de protons mais ne laissant pas passer le dihydrogène ni le dioxygène, ce qui représente également un coût important et amène des contraintes, notamment concernant la géométrie de la pile.

Dans les bio-piles, ce sont des enzymes ou des bactéries qui catalysent de manière sélective les réactions d'oxydation, cette fois de composés organiques comme des sucres ou des alcools, et de réduction de l'oxygène¹⁴. Celles-ci possèdent donc le double avantage d'utiliser des combustibles et des catalyseurs de nature renouvelables et de pouvoir se passer de membranes semi-imperméables. Par contre, les enzymes ou bactéries doivent être maintenues assez proches des électrodes : un médiateur est donc nécessaire pour transférer efficacement les électrons entre les enzymes ou bactéries et les électrodes (**Figure A.5**). Des matrices composées de polymères couplés à des complexes d'osmium, composé toxique, ou des nanotubes de carbone sont utilisés à cette fin.

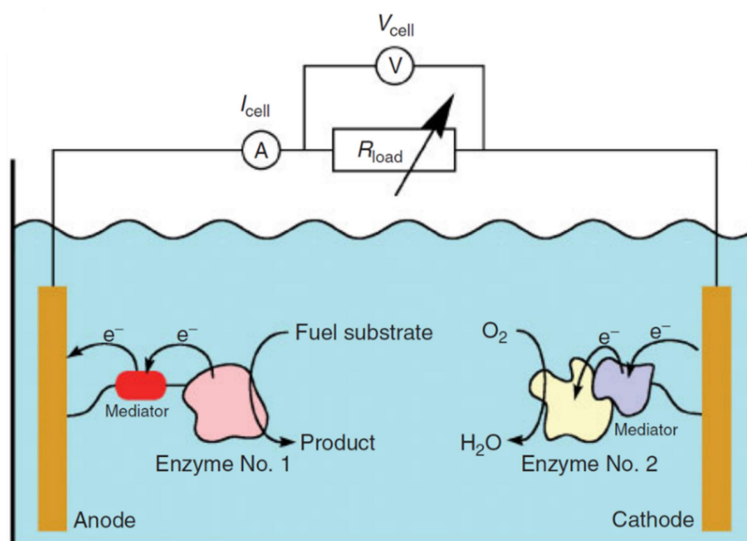


Figure A.5 : Schéma expliquant le principe de fonctionnement d'une biopile enzymatique
Tiré de Willner I. & Katz E.³

La technologie est aujourd'hui assez avancée pour être compatible avec certains dispositifs de faible puissance (quelques dizaines à une centaine de μW). Les dispositifs médicaux implantables sont particulièrement visés, un pacemaker ne nécessite typiquement qu'une dizaine de μW , avec l'idée d'utiliser des molécules directement présentes dans l'organisme hôte comme combustible. Ainsi, les bio-piles enzymatiques fonctionnant grâce au glucose sont l'objet d'un développement soutenu ayant conduit aux premières implantations chez le rat en 2010^{15,16}. Des voies d'amélioration sur l'ingénierie de catalyseurs enzymatiques ou microbiens plus performants, sur les méthodes d'immobilisation et de maintien de ces catalyseurs au voisinage des électrodes et enfin sur le développement de médiateurs plus efficaces et biocompatibles.

I.2. Les enjeux de l'interfaçage électronique/biologie

Ces exemples montrent que l'utilisation de composants biologiques représente une solution sérieuse répondant aux nouveaux besoins en dispositifs biocompatibles, suffisamment robustes, flexibles, sensibles, et de dimensions toujours plus réduites, devant lesquels l'électronique inorganique classique est limitée. La synthèse de molécules biologiques peut être considérée simple si réalisée par des organismes vivants via des mécanismes optimisés d'autoréplication et d'auto-assemblage et l'exécution de leurs fonctions nécessitent très peu d'énergie. Néanmoins, le potentiel de la bioélectronique ne pourra être exploité pleinement que si la qualité de l'interfaçage biologie/électronique inorganique progresse. Celui-ci doit répondre à de nombreuses exigences permettant la connexion entre deux environnements très différents et à priori incompatibles^{2,17}.

D'un côté les systèmes de l'électronique inorganique fonctionnent grâce à des flux d'électrons, ces derniers se déplaçant dans le réseau cristallin de matériaux semi-conducteurs dont le niveau de conductivité peut être finement ajusté par dopage. De l'autre, les composés biologiques relèvent intrinsèquement de l'électronique organique. Ils requièrent de plus la plus part du temps un environnement hydraté. Leur structure supramoléculaire repose en grande partie sur des interactions non-covalentes (interactions de Van der Waals, liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques etc...). D'un point de vue cristallographique, ceux-ci sont amorphes ou faiblement ordonnés, en tout cas bien loin de la perfection de la structure atomique cristalline des matériaux de l'électronique conventionnelle. De plus, les molécules et systèmes biologiques opèrent de multiples réactions chimiques et communiquent par interactions chimiques. Les vecteurs de l'information ne sont donc pas seulement des électrons mais également des ions et en particulier des protons.

Les interfaces pour la bioélectronique doivent donc posséder une grande sensibilité pour ces signaux biologiques, souvent faibles, ainsi que permettre une conversion fidèle, et si possible bidirectionnelle, des signaux électroniques et ioniques. Elles doivent également garantir la stabilité des différents composés inorganiques et issus du vivant ainsi que la compatibilité avec les milieux biologiques, notamment en limitant le déclenchement des réactions de

défense immunitaire. Enfin, l'idéal serait de créer des interfaces convenant à diverses applications et facilement adaptables pouvant ainsi être produites à grande échelle à coût raisonnable.

Le développement récent de nanomatériaux tels que les nano-fils de silicium, les nanotubes de carbone ou encore le graphène ont permis quelques avancées¹. Les technologies basées sur ce type de matériaux sont encore jeunes et, dans le domaine de la bioélectronique, leurs propriétés semi-conductrices sont surtout exploitées pour l'élaboration de nano-transistors à effet de champ. Ces dispositifs ont l'avantage d'être sensible aux charges électriques de n'importe quelle nature, de pouvoir être fonctionnalisés et d'être compatibles avec l'électronique conventionnelle (**Figure A.6**). Ils sont par conséquent surtout utilisés en tant qu'éléments sensibles dans des capteurs pour la détection de molécules chimiques et biochimiques, le suivi de paramètres physiologiques tels que le pH ou l'enregistrement de l'activité électrique des neurones et des cardiomyocytes².

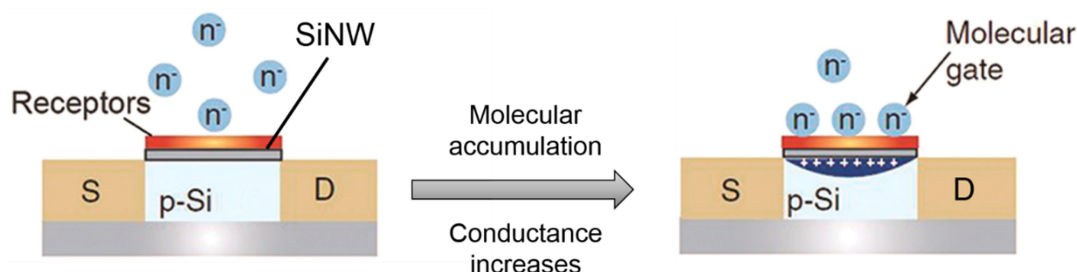


Figure A.6 : Schéma montrant le principe de fonctionnement d'un transistor à effet de champ (FET) pour la détection de molécules d'intérêt. Le nano-fil de silicium (SiNW) fonctionnalisé avec des récepteurs organiques reconnaissant les molécules d'intérêts fait la jonction avec le reste du dispositif inorganique. La liaison des molécules cibles chargées négativement aux récepteurs modifie les propriétés électriques du semi-conducteur (SiNW et p-Si) de la même façon que la polarisation de la grille d'un FET standard.

Adapté de Zhang A. & Lieber C. M.²

Grâce aux faibles dimensions de ces matériaux et à leur rapport surface/volume élevé, l'intégration de molécules biologiques est facilitée et la sensibilité de ces capteurs est améliorée même si la résolution n'est pas encore à la hauteur de celle des organismes biologiques qui communiquent avec des signaux pouvant être constitués d'une molécule unique. Les nanotubes de carbone sont également de très bons médiateurs électroniques pour les bio-piles à combustible. Par contre, la synthèse des nanomatériaux est complexe et difficile à contrôler, notamment pour les produire à grande échelle de façon homogène, ce qui freine grandement leur utilisation. Une autre limitation est qu'ils ne sont pas prêts à être utilisés dans des dispositifs implantables. D'une part parce que si la partie détecteur des biocapteurs a pu être suffisamment miniaturisée grâce à ces matériaux, ce n'est pas encore le cas des autres parties de ces dispositifs (électrodes, connectique, alimentation, support etc...), d'autre part à cause des suspicions de toxicité des nanomatériaux pour l'organisme et du peu de recul que l'on a par rapport à leur stabilité dans les milieux biologiques. Enfin, il est également nécessaire de communiquer dans l'autre direction, c'est-à-dire vers les milieux biologiques, or les semi-conducteurs inorganiques ne sont peut-être pas les meilleurs candidats pour parvenir à mimer ou reproduire la variété des signaux biologiques.

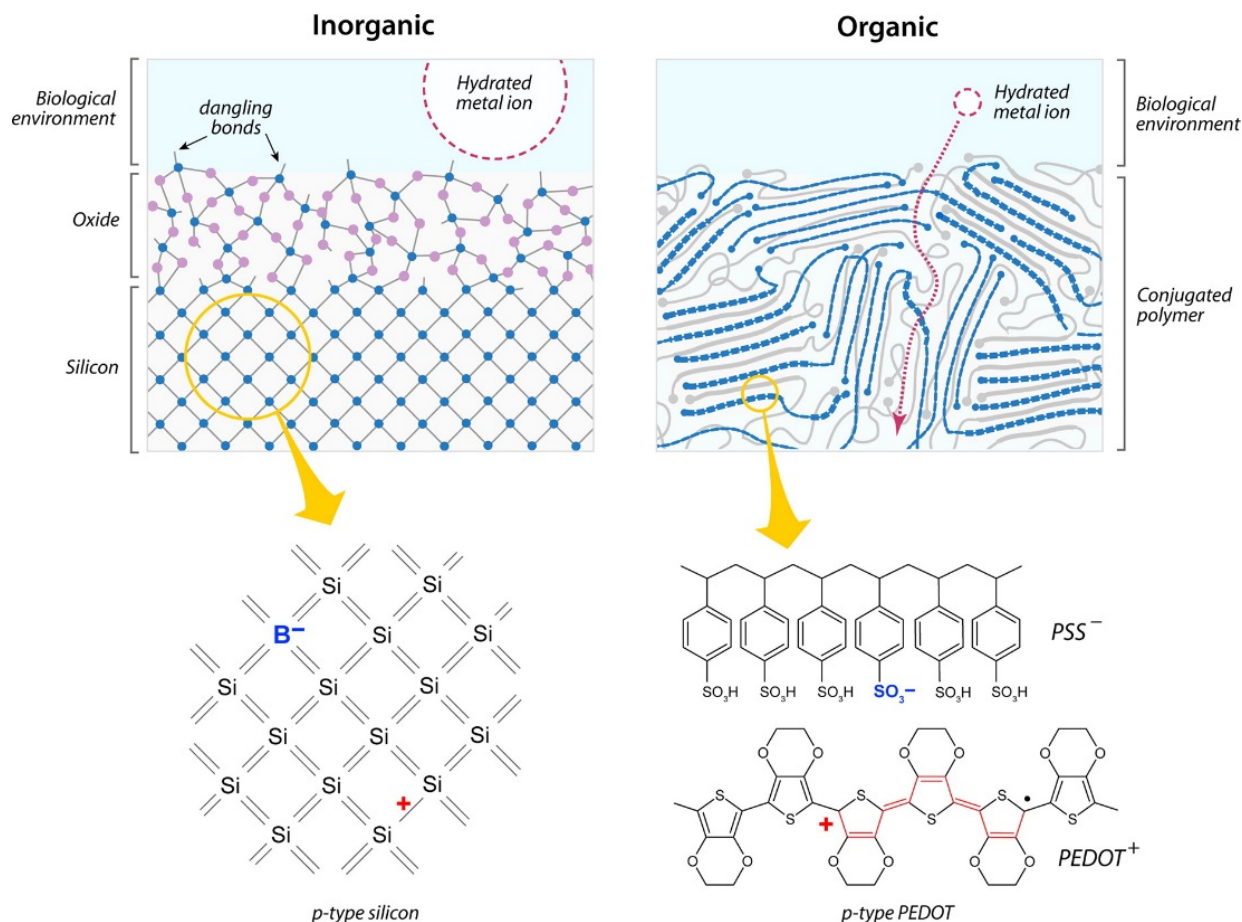


Figure A.7 : Matériaux semi-conducteurs inorganiques vs organiques pour l'élaboration de transistors à effet de champ pour la bioélectronique : sur cet exemple, le silicium dopé *p* par introduction d'un atome de bore dans sa structure et le polymère PEDOT également dopé *p* par le polymère PSS. Contrairement aux semi-conducteurs inorganiques séparés du milieu biologique par un oxyde, les semi-conducteurs organiques sont directement en contact avec celui-ci et les ions peuvent pénétrer à l'intérieur du volume du matériau. Cette différence est notamment expliquée par la structure de ces matériaux. Notons que la taille de l'ion est identique sur les deux schémas ce qui donne une idée de l'échelle.

Tiré de Rivnay J. *et al*¹⁸

L'électronique organique, qui repose sur les propriétés (semi-)conductrices de certains polymères π -conjugués, possède des avantages faisant d'elle une alternative compétitive face à l'électronique et la nanoélectronique classique¹⁹. Les semi-conducteurs organiques ont une structure beaucoup plus proche des matériaux biologiques leur offrant une plus grande compatibilité chimique et mécanique. La synthèse de ces matériaux est plus aisée et moins coûteuse en énergie tout comme leur fonctionnalisation par modifications chimiques dont les possibilités sont extrêmement larges. Surtout, ils peuvent supporter à la fois un transport électronique et ionique à l'image du polymère le plus utilisé pour la bioélectronique, le PEDOT:PSS (PEDOT : poly(3,4-éthylènedioxythiophène) dopé avec du PSS : poly(styrène sulfonate))²⁰. Un dernier avantage important est que ces polymères fonctionnent au contact direct des électrolytes, contrairement aux semi-conducteurs classiques comme le silicium séparés un oxyde (**Figure A.7**). Les transistors organiques sont également davantage sensibles aux petites fluctuations de potentiel dans ces environnements²¹.

I.3. L'électronique organique

I.3.1. Polymères semi-conducteurs et conducteurs électroniques

Les polymères conducteurs électroniques ont été découverts dans les années 1970 grâce aux travaux des Pr. A.J Heeger, Pr. A.G. MacDiarmid et Pr. H. Shirakawa sur le polyacétylène, récompensés par le prix Nobel de Chimie en 2000. Ceux-ci ont montré que des polymères pouvaient conduire l'électricité sous certaines conditions avec des valeurs de conductivité allant de 10^{-5} à 10^3 S.cm^{-1} ce qui les classe dans la catégorie des matériaux semi-conducteurs.

Il est d'abord nécessaire que le polymère possède une structure π -conjugué, c'est-à-dire, en première approximation, que sa chaîne principale doit être constituée d'une alternance de liaisons simples (liaisons σ) et double ou triple (liaisons π) pour assurer une délocalisation électronique (**Figure A.8(a)**). Aujourd'hui, les polymères basés sur des motifs contenant des (hétéro)cycles aromatiques sont le plus souvent utilisés en raison de leur meilleure stabilité et de leur plus grande disposition à délocaliser les électrons. Mais cela ne suffit pas, il faut également que le polymère puisse être dopé²². En s'inspirant du dopage des semi-conducteurs inorganiques, il s'agit d'introduire des défauts chargés dans la structure du matériau qui lui conféreront ses propriétés de conduction électrique. Pour continuer avec l'analogie inorganique/organique, le comportement électrique de ces polymères est le plus souvent décrit grâce la théorie des orbitales moléculaires qui est à la chimie organique ce qu'est la théorie des bandes à la physique du solide, les bandes de valence et de conduction équivalant aux orbitales moléculaires la plus haute occupée (HOMO) et la plus basse vacante (LUMO) respectivement. Les charges additionnelles introduites par dopage induisent une déformation locale dans la structure π -conjuguée du polymère et induit une réorganisation de leur structure électronique. D'un point de vue énergétique cela se traduit par l'apparition entre les niveaux HOMO et LUMO de nouveaux états électroniques localisés (**Figure A.8(b)**). Sous l'effet d'un champ électrique, ces défauts chargés vont pouvoir se déplacer d'un état intermédiaire à l'autre grâce à des mécanismes de sauts (*hopping*) ou par effet tunnel intra-chaîne ou même inter-chaîne dans le cas des polymères contenant des cycles aromatiques qui peuvent alors établir des interactions inter-chaînes par empilement π (π - π stacking).

Différentes techniques de dopage existent, associées à des propriétés et applications particulières. Le dopage par réaction (électro)chimique (oxydation/réduction) octroie aux polymères des propriétés permanentes semi-conductrices voire conductrices pour les plus fortement dopés. Ce type de dopage est réversible, il suffit de réaliser la réaction d'oxydoréduction inverse. Une autre voie de dopage est l'injection de charge à l'interface d'une électrode métallique. Le dopage est ici transitoire, le polymère retournant à son état neutre dès l'arrêt de l'application de la tension aux électrodes. Enfin il est également possible de créer des charges transitoirement par photo-excitation du matériau.

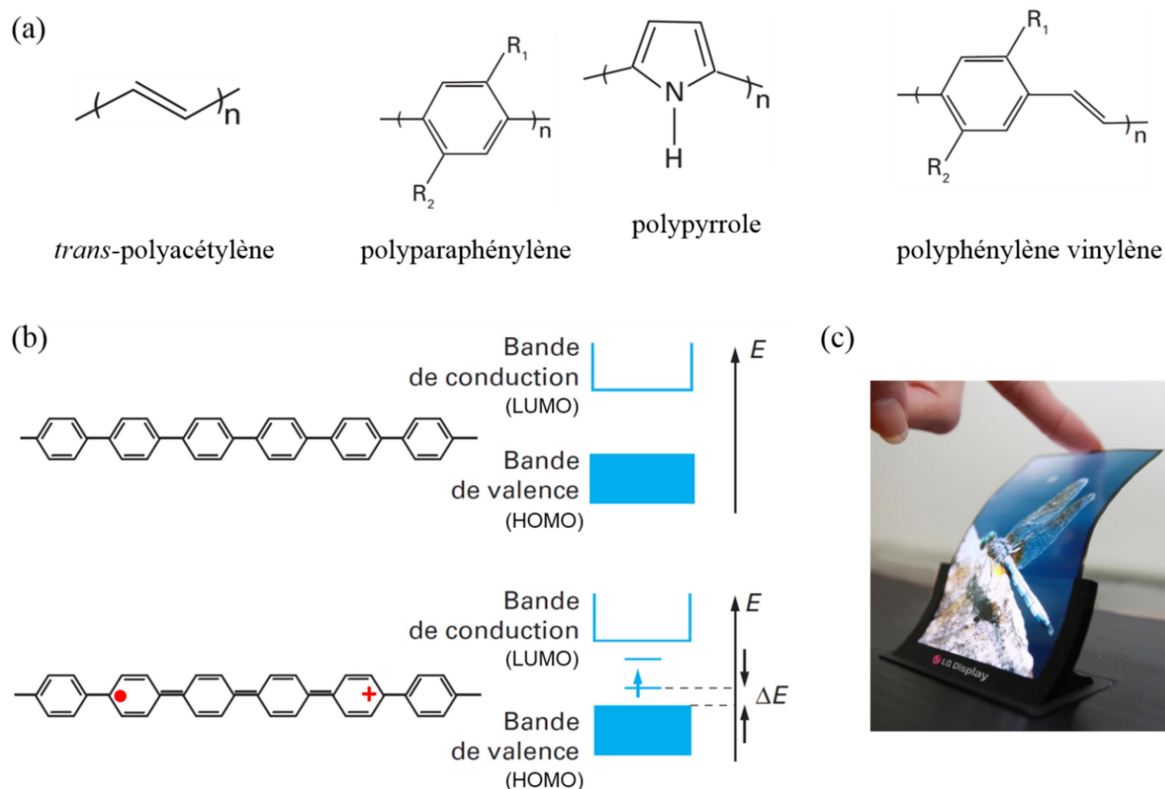


Figure A.8 : (a) exemples de systèmes π -délocalisés : chaînes carbonées alternant simples et doubles liaisons, chaînes contenant des (hétéro)cycles aromatiques et chaînes alternant (hétéro)cycles et doubles liaisons. (b) Dopage d'un polymère neutre (polyparaphénylène) par injection de charge et représentation schématique de la structure en bandes correspondante. (c) Exemple d'écran flexible réalisé grâce à des OLEDs.

Adapté de Attias A.-J.²² (a)&(b)

Ces polymères semi-conducteurs sont aujourd'hui utilisés dans de nombreuses applications comme des diodes électroluminescentes (OLEDs), des transistors à effet de champ organiques (OFETs) ou des cellules photovoltaïques (**Figure A.8(c)**). De plus, ils offrent des possibilités importantes pour la bioélectronique et en particulier pour les dispositifs implantables puisqu'ils permettent l'élaboration de dispositifs électroniques transparents et souples, s'adaptant mieux aux contraintes mécaniques des tissus biologiques. Mais dans ce domaine, c'est surtout la capacité qu'ont certains polymères comme le PEDOT:PSS à supporter une conduction hybride d'électrons/trous et d'ions/protons au contact direct avec des électrolytes qui est la plus intéressante à exploiter.

Dans un but de clarté, on empruntera des termes usuels issus de l'électronique inorganique et on parlera d'électrons (respectivement de trous) dans le cas de défauts chargés négativement (positivement) et de dopage de type- n ($-p$).

I.3.2. Polymères conducteurs mixtes électroniques et ioniques

Comme précédemment expliqué, l'élaboration de matériaux conducteurs ioniques, et mieux encore mixte ionique/électronique, est capitale pour le développement de dispositifs et interfaces bio-intégrables. Les polymères se positionnent comme de bons candidats¹⁸. Les milieux biologiques peuvent être considérés comme des électrolytes aqueux puisqu'ils sont hydratés et renferment de nombreuses espèces ioniques (H^+ , Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} ...). Les polymères sont dans ces situations utilisés sous la forme de films ou de membranes déposés à la surface d'une électrode ou entre des électrodes et, d'autre part, en contact avec un électrolyte d'intérêt. L'électrolyte fait ici partie intégrante du système. Les ions de l'électrolyte peuvent pénétrer et circuler dans la matrice du film par diffusion ou électromigration²³, plus ou moins facilement suivant les propriétés du film (charge du polymère, densité du maillage et hydrophilie du film...). En particulier, ce transport ionique est d'autant plus performant que l'hydratation du matériau est élevée. Les meilleurs conducteurs ioniques peuvent même être qualifiés d'hydrogels à cause de leur grande capacité à capter l'eau, ce qui provoque un gonflement du film.

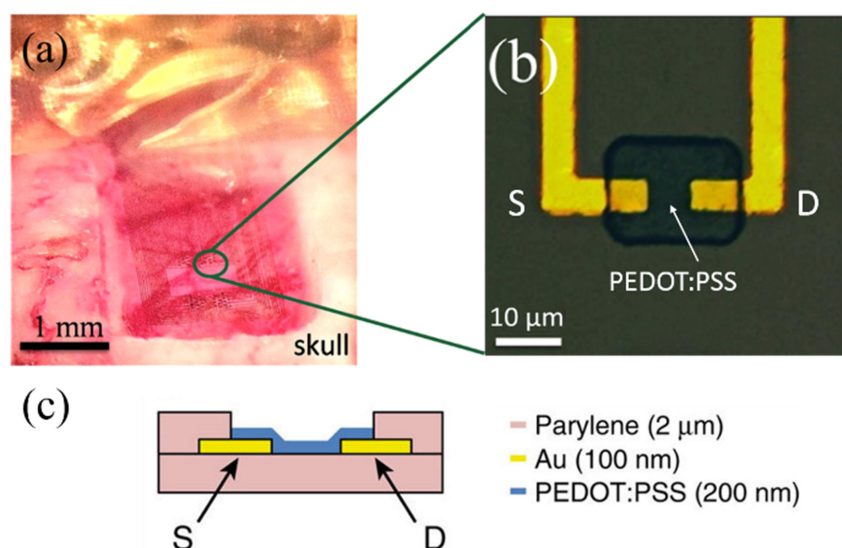


Figure A.9 : Transistor électrochimique organique (OEET) pour l'enregistrement de l'activité cérébrale. Images de microscopie optique (a) du dispositif implanté dans le cortex somatosensoriel d'un rat et (b) des détails du circuit électronique. (c) Schéma de la coupe latérale de l'OEET. PEDOT:PSS est le matériau actif du canal. La source et le drain, respectivement S et D, sont identifiés.

Adapté de Khodagholy D. *et al*²⁴.

Le PEDOT:PSS est le polymère conducteur mixte le plus utilisé aujourd'hui en bioélectronique car il présente à la fois une forte conductivité électronique (jusqu'à *ca.* 10^3 S.cm⁻¹) et une conduction ionique intéressante à température ambiante²⁵. Il possède également une bonne capacité à contacter efficacement des électrodes métalliques²⁰, est stable au contact de l'air et d'électrolytes et semble avoir une bonne biocompatibilité²⁶. Il est formé de deux polymères liés par des interactions Van der Waals, un polymère π -conjugué (PEDOT) et PSS contenant des groupements pendants sulfonates chargés négativement qui permet de rendre l'ensemble dispersables en milieux aqueux. Ces charges négatives sont compensées par les

cations de l'électrolyte qui pénètrent dans le film, ou bien par la formation de trous dans la chaîne de PEDOT (dopage de type-p), **Figure A.7**. Les variations de la concentration cationique de l'électrolyte entraîne donc une modification de la densité de trous et par conséquent des propriétés conductrices du PEDOT. Ce principe, permettant la conversion d'un signal chimique en un signal électronique, est exploité pour la réalisation de transistors électrochimiques organiques (OECT)^{18,25} pour les biocapteurs (**Figure A.9**).

A l'inverse, l'injection de trous dans la chaîne PEDOT via une électrode polarisée provoque le relargage des cations liés à PSS dans l'électrolyte. Il a ainsi été montré qu'il était possible de contrôler électriquement, grâce à des pompes ioniques organiques (OEIP), le relargage d'ions dans des milieux aqueux et même dans des cellules neuronales²⁶ (**Figure A.10**) ce qui ouvre de belles perspectives pour la délivrance de médicaments ciblée et le contrôle de l'activité cellulaire et autres systèmes biologiques. Ces dispositifs sont très sensibles grâce à l'interaction directe et très étroite des électrolytes dans tout le volume du film de polymère conducteur.

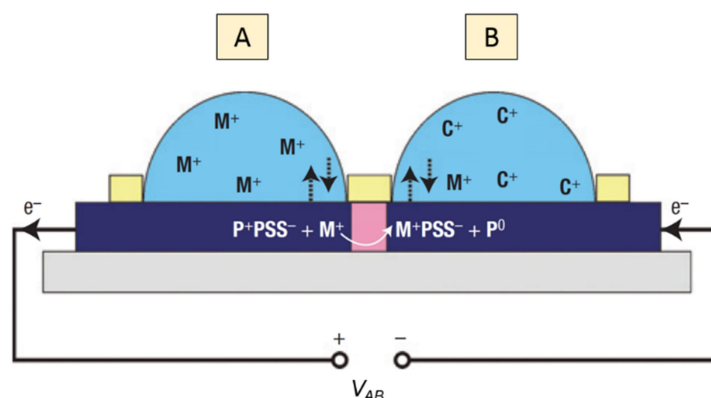


Figure A.10 : Schéma d'une pompe ionique organique (OEIP) entre deux électrolytes, A et B. La région suroxydée de PEDOT:PSS (en rose) est perméable aux ions et imperméable aux électrons. La différence de potentiel V_{AB} provoque le mouvement des électrons dans le circuit. A l'anode, l'injection de charges positives (trous) dans la chaîne polymère du PEDOT (ici noté P) est compensée par les charges négatives de PSS ce qui libère des ions M^+ . Ces derniers migrent vers la cathode où PSS est réduit. De cette façon, un flux d'ions M^+ s'établit du compartiment A vers le compartiment B.

Tiré de Isaksson J. *et al.*²⁶

I.3.3. Cas de la conduction protonique et le mécanisme de Grotthuss

Les protons (H^+) sont issus de l'ionisation des atomes d'hydrogène qui, avec le carbone, sont les principaux constituants des molécules organiques. L'hydrogène est également omniprésent dans les milieux biologiques puisque deux de ces atomes associés à un atome d'oxygène forment une molécule d'eau, élément essentiel à la viabilité de tout système biologique de sa plus petite unité, la cellule, jusqu'à l'organisme entier. Il entre également en jeu dans l'établissement des interactions particulières que sont les liaisons hydrogène (liaisons-H) extrêmement répandues dans les systèmes organiques et spécialement biologiques. Sans surprise, les mécanismes transport de charge en biologie impliquent fréquemment des protons²⁷. Au-delà de ces considérations, la conduction protonique est à considérer

séparément de la conduction ionique classique du fait de la particularité de cet ion H^+ de petite taille puisque constitué d'un unique proton et qui est le seul ion dépourvu de nuage électronique. Cela en fait une espèce instable très réactive qui interagit avec les molécules de solvant, en particulier avec les molécules d'eau pour former les ions hydroxyde OH^- et hydronium H_3O^+ .

Deux principaux processus de transport protonique peuvent avoir lieu dans les milieux hydratés, le transport véhiculaire et le mécanisme de Grotthuss^{28,29} (**Figure A.11**). Le premier cité est simplement un cas particulier de la diffusion ionique. Le proton, instable sous sa forme H^+ , réagit avec une espèce protonable X pour former un ion XH^+ (H_3O^+ dans le cas de l'eau) qui ensuite diffuse classiquement³⁰. Ce mécanisme de transfert de charge est donc accompagné d'un transfert de masse, contrairement au mécanisme de Grotthuss où seule la charge nette est transférée sans déplacement de matière.

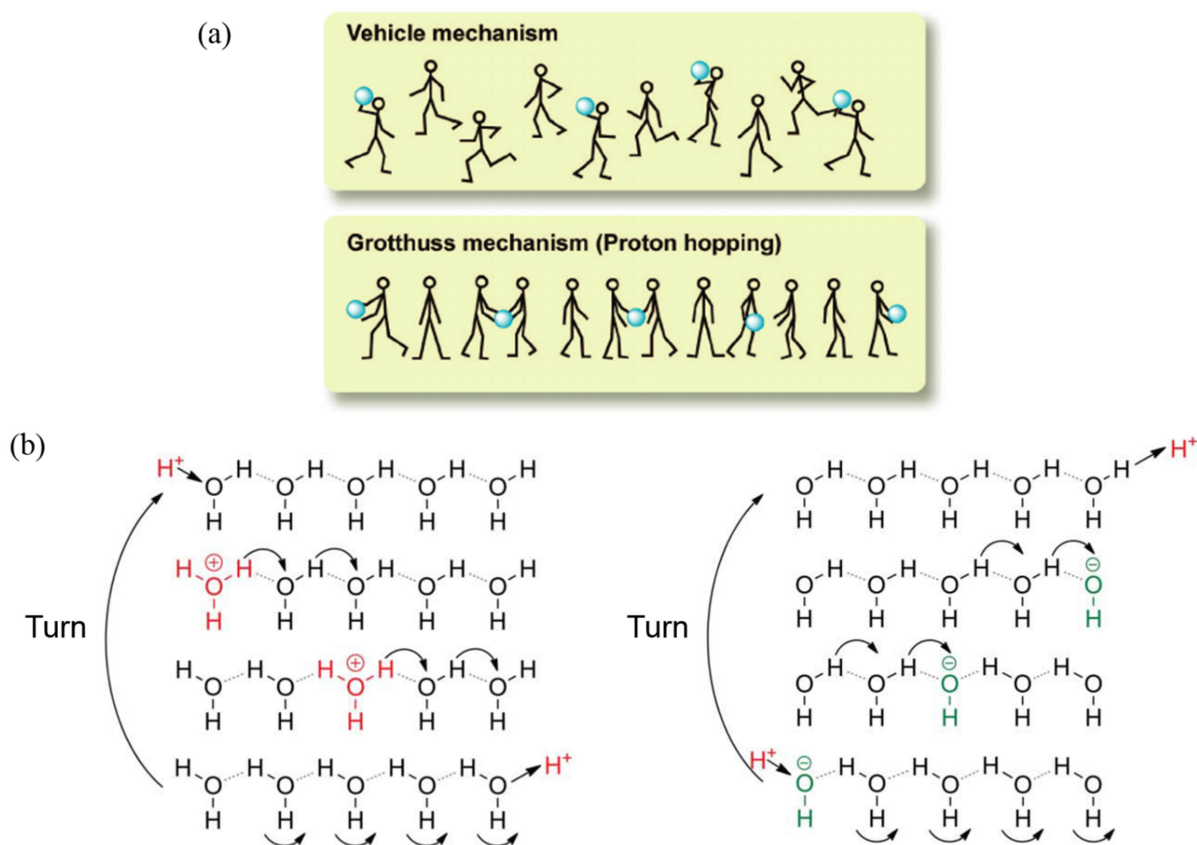


Figure A.11 : (a) Illustration des deux modes de transport de protons : transport véhiculaire (haut) et mécanisme de Grotthuss (bas). (b) Schéma décrivant le mécanisme de saut de proton le long d'un réseau de molécules d'eau liées par liaisons-H puis la réorientation de ce dernier après le passage de la charge (gauche) et schéma équivalent pour le passage d'un "trou protonique" (droite).

Tiré de Ueki T. et Watanabe M.³¹ (a) et de Deng Y. *et al.*³² (b)

Le mécanisme de Grotthuss implique la présence d'un réseau de molécules d'eau stabilisé par des liaisons-H. Ce modèle, bien qu'imparfait, est fréquemment utilisé pour expliquer les particularités du transfert de protons à longue portée en solution et dans les milieux biologiques, notamment la grande mobilité des ions H_3O^+ et OH^- observée dans l'eau et

surtout dans la glace³³. Il décrit le transfert d'un proton à travers le réseau de liaisons-H par sauts ou effet tunnel d'une molécule à l'autre. Ce processus ressemble à celui permettant le transfert des défauts chargés dans les chaînes de polymères π -conjugués, à la différence qu'ici les liaisons structurant le réseau ne sont pas toutes covalentes. Ainsi, ce phénomène s'accompagne d'une réorientation des molécules d'eau et le réseau doit ensuite reprendre sa conformation initiale pour que le proton suivant puisse être transféré^{33,34} (**Figure A.11(b)**).

Ces deux processus permettent pareillement le passage de OH^- qui peuvent être considérés comme l'équivalent des trous en électronique³⁵.

De manière générale, le transport de protons est un processus thermiquement activé dont l'énergie d'activation E_a est reliée à la conductivité σ du matériau par la relation d'Arrhenius^{28,29} :

$$\sigma = A e^{\frac{E_a}{k_b T}} \quad \left| \begin{array}{l} \text{Avec } k_b \text{ la constante de Boltzmann, } T \text{ la température et } A \\ \text{le facteur pré-exponentiel.} \end{array} \right.$$

Dans cette équation, le facteur pré-exponentiel rend compte, entre autres, du mécanisme de transport ionique à l'œuvre au sein du matériau²⁹. Le transport de protons via un mécanisme de type Grotthuss serait préféré lorsque la formation des réseaux d'eau liés par liaison-H est facilitée, par exemple dans la glace, dans les électrolytes polymères comme le Nafion (membranes échangeuses d'ions dans les cellules électrochimiques), dans les milieux confinés (nanotubes de carbone, nano-canaux), etc... . Dans ces milieux, l'augmentation de la viscosité, les interactions avec les molécules ou avec les interfaces permettent l'organisation de réseaux plus stables et plus étendus.

Il est largement reconnu que le mécanisme de Grotthuss est un modèle trop simple pour expliquer toutes les particularités du transport protonique sur de longues distances. En particulier, l'influence de l'environnement est importante et complexe³⁵. On notera par exemple que les réseaux ne sont pas toujours entièrement constitués de molécules d'eau, les groupes acido-basiques de molécules peuvent en faire partie. De plus, des interrogations persistent (en générant d'intenses débats) sur l'étape critique de cette réaction : le passage du proton d'une molécule d'eau à la suivante, ou bien la réorganisation du réseau d'eau après le passage du proton et absolument nécessaire pour permettre le transfert du suivant^{34,36,37}. En général, l'énergie d'activation nécessaire à un mécanisme de transport de type Grotthuss est d'au moins 100 meV^{38,39}, énergie nécessaire à la rupture de la liaison-H, mais est généralement plus proche de *ca.* 250 meV⁴⁰. Le transport véhiculaire implique quant à lui le déplacement d'espèces de masses plus importantes que le proton, c'est pourquoi il requiert d'avantage d'énergie. L'énergie d'activation serait dans ce cas supérieure à 400 meV²⁹.

II- Electronique et matériaux biologiques

Depuis les années 1940, il est connu que des processus essentiels au métabolisme des organismes comme la respiration cellulaire font intervenir des réactions de transfert de charge⁴¹. Cette fonction est principalement réalisée par les protéines. Les mécanismes de transfert de charge dans les protéines ont été depuis intensément étudiés. Pourtant, les matériaux biologiques sont généralement considérés comme des isolants électriques et peu d'études sur leurs propriétés de conduction ont été réalisées. L'intérêt grandissant pour la bioélectronique depuis le début des années 2000 couplé à la découverte, dans les mêmes années, des nano-fils et pilis bactériens, conducteurs électroniques naturels, poussent la communauté scientifique à s'intéresser encore d'avantage à l'étude des propriétés électroniques des matériaux biologiques. Les structures fibrillaires auto-assemblées comme l'ADN, certains pigments, les architectures du type amyloïde, etc..., sont particulièrement sous les feux des projecteurs en raison des avantages manifestes de ces matériaux pour l'électronique (grand facteur de forme, facilité d'élaboration, multiples possibilités de fonctionnalisation...). Les protéines en général sont également étudiées avec attention en tant que matériaux conducteurs puisque ce sont essentiellement ces molécules qui assurent les réactions transfert de charges en biologie. Après la présentation des principaux mécanismes de transport de charges dans les protéines, un bref état des lieux sur la conductivité électrique de ses matériaux biologiques sera dressé avec un focus particulier pour les fibres amyloïdes et structures biomoléculaires s'en rapprochant.

II.1. Le transfert de charge dans les protéines

Le transfert de charges électriques est essentiel à tout organisme vivant. Il est au cœur des processus biologiques essentiels à la vie : pour l'extraction d'énergie et pour l'ensemble des voies métaboliques. Les porteurs de charges sont aussi bien des électrons, plutôt impliqués dans des processus localisés, et des ions, autant engagés dans des réactions localisées que comme vecteurs d'information sur de grandes distances. De plus, dans l'environnement aqueux des systèmes biologiques, les mécanismes de transfert d'électrons sont très fréquemment couplés au transport ionique, notamment protonique. Enfin, les protéines jouent un rôle capital dans ces processus de transferts de charges. Par exemple, chez les organismes eucaryotes, la chaîne respiratoire mitochondriale permet la production d'énergie via la synthèse de l'ATP⁴². Les électrons circulent de donneurs en accepteurs via des complexes protéiques insérés dans la membrane des mitochondries (**Figure A.12**). Ces réactions

produisent un gradient de proton de part et d'autre de la membrane. Le gradient électrochimique ainsi créé est ensuite utilisé par la protéine ATP synthase pour phosphoryler l'ADP en ATP. Chez les plantes, algues et certaines bactéries, la production d'ATP grâce à la photosynthèse repose sur le même principe⁴³.

II.1.1. Le transfert d'électrons

En biologie, le transfert d'électrons (ET) d'un donneur à un accepteur est principalement effectué grâce à des enzymes redox, protéines capables de catalyser des réactions d'oxydo-réduction. Les centres actifs de ces protéines, ou centre redox, sont la plupart du temps associés à un ou plusieurs métaux de transitions (fer, cuivre, nickel...) pouvant recevoir ou donner des électrons par respectivement réduction ou oxydation de ces derniers par l'enzyme. Les protéines réalisant ces fonctions redox sont classées en quatre catégories, les cytochromes, les protéines fer-soufre, les protéines à cuivre et les flavoprotéines⁴⁴. Seules les flavoprotéines font intervenir, non pas un cofacteur redox métallique, mais organique : la flavine adénine dinucléotide ou la flavine mononucléotide.

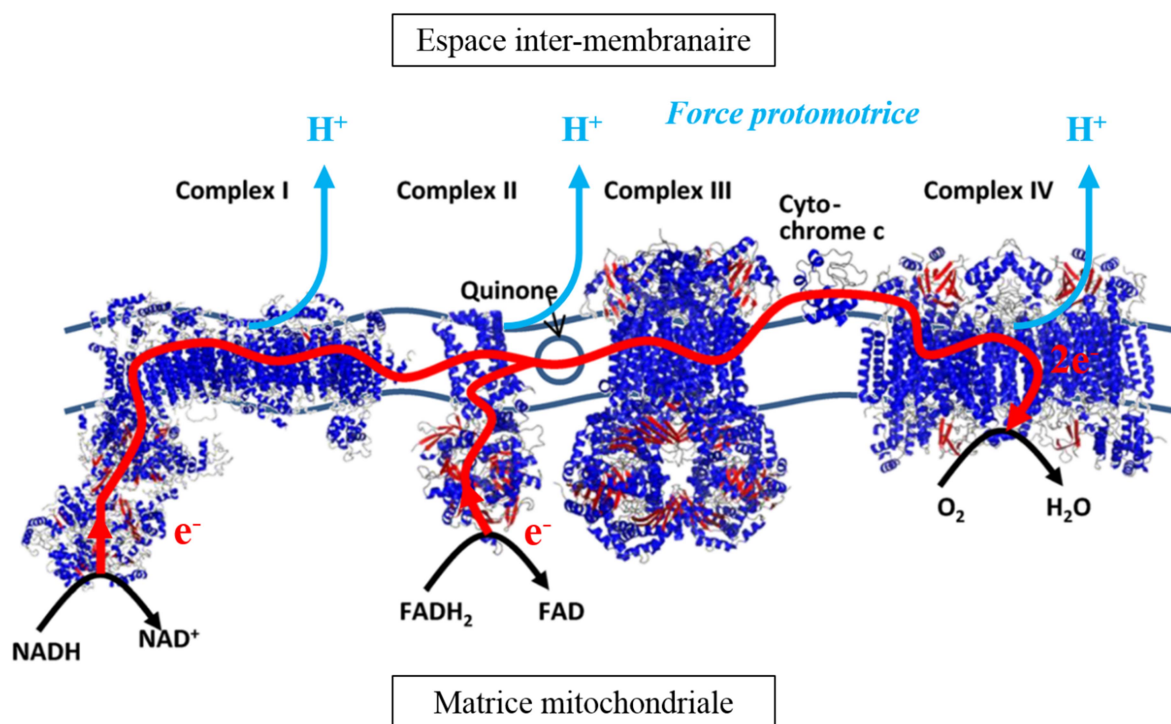


Figure A.12 : Schéma indiquant le transfert d'électrons (en rouge) dans le processus de respiration cellulaire se produisant dans les mitochondries. Celui-ci entraîne simultanément un relargage de protons (flèches bleues) dans l'espace inter-membranaire, qui engendre à son tour un gradient de part et d'autre de la membrane interne des mitochondries. Cette force protomotrice est ensuite utilisée par l'ATP-synthase pour la production d'ATP (étape non montrée). Adapté de Amdursky A.⁴⁵

Par ailleurs, les centres donneurs (D) et accepteurs (A) d'électrons, au sein d'une même protéine ou entre différents acteurs d'un complexe protéique, sont toujours espacés physiquement par des parties protéiques non conductrices. En effet, les protéines sont avant tout des chaînes organiques saturées : il ne peut donc pas y avoir de conduction par

délocalisation électronique sur de grandes distances comme cela se produit dans les polymères conducteurs électroniques. Deux mécanismes permettant le passage de cette barrière par les électrons sont admis : des mécanismes dit de sauts et des mécanismes par effet tunnel⁴⁶. Ceux-ci décrivent le passage d'un électron entre deux états électroniques énergétiquement accessibles séparés par un "pont" d'acides aminés, de nature électrique plutôt isolante, séparant D et A. Le niveau d'énergie de D est toujours plus élevé que celui de A (**Figure A.13**).

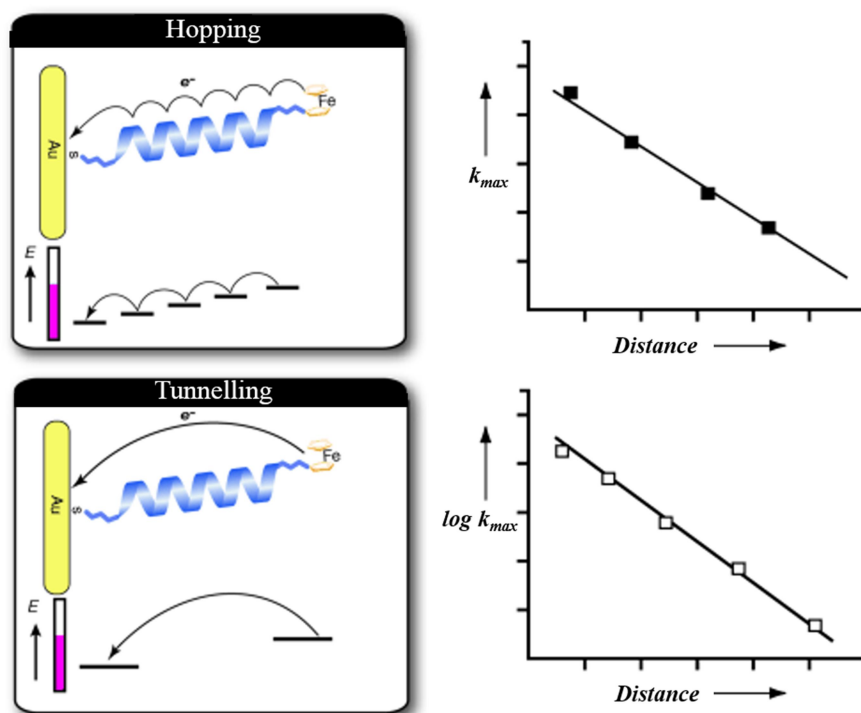


Figure A.13 : Schéma représentant les processus de transfert d'électron par saut (haut) et par effet tunnel (bas). Dans cet exemple, le donneur d'électron est le ferrocène et l'accepteur une électrode d'or. Le taux de transfert d'électron décroît linéairement dans le cas du processus de saut et exponentiellement dans le cas de l'effet tunnel.

Tiré de Long Y.-T. *et al.*⁴⁶

- **Effet tunnel** : Lors de ce processus l'électron est échangé en une seule étape, le transport est dit cohérent. Ici, le pont d'acides aminés séparant D et A sert simplement comme moyen de transfert. Il s'agit d'un phénomène quantique. Ce mécanisme est possible notamment lorsque le pont est plus haut en énergie que le donneur et si les sites D et A sont suffisamment proches. L'électron peut alors passer de D à A par effet tunnel. Ce modèle est basé sur la théorie de Marcus qui décrit que le taux de cette réaction de transfert décroît exponentiellement avec la distance d'éloignement entre D et A⁴⁷.

- **Saut d'électrons**: Il s'agit d'un mécanisme de transport incohérent où un électron est transféré de D à A en plusieurs étapes via le pont peptidique. Contrairement à l'effet tunnel, les électrons peuvent résider temporairement sur le pont en occupant les niveaux énergétiques accessibles de certains acides aminés relais. Ce phénomène est possible si les états d'énergie successivement occupés depuis le donneur jusqu'à l'accepteur sont énergétiquement

décroissants. Ce processus est moins dépendant de la distance entre D et A (dépendance linéaire).

La présence de l'un ou l'autre des mécanismes est très difficile à prouver dans les matériaux biologiques. Les études font toujours débat. En effet, beaucoup de paramètres peuvent fortement influencer le transport électronique : comme mentionné précédemment, l'effet de la distance D/A est le paramètre le plus systématiquement regardé (*vide supra*). La nature des acides aminés du pont est également déterminante⁴⁸. Les résidus (hétéro)aromatiques, en particulier la tyrosine et le tryptophane sont connus pour participer à instaurer un environnement électronique favorable au transfert d'électrons au sein d'une même protéine ou entre plusieurs protéines et/ou autres molécules⁴⁹. En effet, les électrons π de leurs (hétéro)cycles aromatiques sont moins fortement liés donc plus facilement délocalisables. Autrement dit, le potentiel d'oxydation de leur chaîne latérale est assez faible et dans le cas du mécanisme de saut, ils peuvent jouer le rôle de relai. D'autres facteurs ont également une incidence non négligeable sur le transfert électronique comme la température, la dynamique de la protéine, l'abondance de liaisons-H ou encore le moment dipolaire⁵⁰. Il semblerait que le mécanisme de saut domine le plus souvent, notamment pour les transferts d'électrons sur des distances supérieures à *ca.* 2 nm⁵¹ tandis que l'effet tunnel serait favorisé dans le cas de transferts sur des distances plus courtes chez les petits peptides à structure rigide⁴⁶.

II.1.2. La conduction ionique et protonique

Les ions sont les principaux vecteurs du transport de charges dans les systèmes biologiques. La conduction ionique est notamment une des voies de signalisation très longue distance permettant la communication intracellulaire, entre les différentes organelles, et la communication des cellules avec le milieu extérieur. Le principal mode de conduction des ions est la diffusion, rendue possible dans les systèmes biologiques par l'omniprésence de l'eau, et qui se fait généralement selon des gradients de concentration. Le transport ionique peut aussi être aidé par des protéines notamment pour le passage des membranes entre différents compartiments, assuré par des protéines membranaires comme les canaux et transporteurs ioniques. Les pompes ioniques peuvent même transporter des ions contre leur gradient électrochimique⁵².

Un des phénomènes électriques biologiques les plus connus repose sur la présence de ce type de protéine membranaire : la propagation des potentiels d'actions le long des neurones. Ce mécanisme original consiste en l'inversion locale de la polarité de la membrane grâce à l'ouverture de canaux ioniques. Ce changement de polarité provoque l'ouverture des canaux voisins et le phénomène se propage de proche en proche. Cela est assez éloigné de la conduction électrique, sujet de notre étude, qui est définie par un flux de porteurs de charges entre deux points de polarisations différentes.

En revanche, le passage des ions via certaines protéines de transport citées plus haut correspond plus à une forme de conduction. C'est notamment le cas du transport passif via les canaux ioniques. Dans ce cas, les ions circulent spontanément à travers le canal en étant

orientés par le gradient de concentration ionique et/ou par le potentiel électrostatique établi par la composition en acides aminés de la protéine⁵³. De plus, les ions peuvent interagir avec les chaînes latérales des résidus, notamment les résidus chargés, situés à l'intérieur du canal, ce qui les guide suivant les effets d'attraction/répulsion. Ce type de transport est rapide, allant jusqu'à un taux de transfert de 10^8 ions par seconde⁵⁴. Les autres types de protéines, les transporteurs et pompes ioniques, procèdent à un transfert ionique plus éloigné d'un phénomène de conduction. En effet, dans ce cas, c'est un processus de modifications structurales coordonnées de la protéine qui entraîne le passage des ions⁵⁴. De plus, dans le cas d'un transport actif contre un gradient de concentration, ce processus consomme de l'énergie sous forme d'ATP.

II.1.2. i) Cas particulier de la conduction protonique

Comme dans le cas des polymères conducteur ioniques, le transfert de protons (PT) est un cas particulier dû aux propriétés physico-chimiques uniques de ses ions, surtout dans les milieux aqueux. En effet, il s'agit du seul cation interchangeable avec les atomes d'hydrogène des molécules d'eau. De plus, les protons interagissent largement avec les protéines, notamment via les groupes acides et basiques ou polaires des acides aminés. C'est pourquoi des mécanismes particuliers de transfert de proton existent en biologie. En particulier, le transport de proton par des mécanismes du type Grotthuss suivant des réseaux de liaisons-H est extrêmement fréquent⁵⁵⁻⁵⁷. Une illustration de ce phénomène est donnée par la **Figure A.14**.

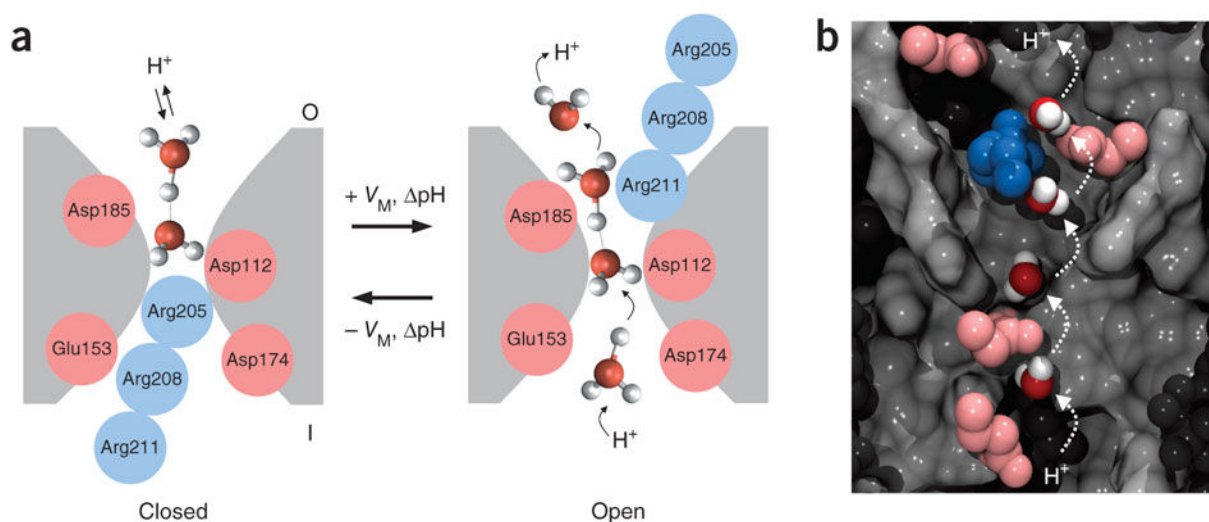


Figure A.14 : (a) Schéma représentant les deux configurations, fermée et ouverte, du canal protonique Hv1. La transition entre ces deux états est provoquée par une modification du potentiel membranaire (V_M) et du gradient de pH inter-membranaire (ΔpH) entraînant un changement conformationnel de la protéine, notamment du cluster d'arginines (en bleu) qui obstrue ou libère le pore du canal. L'ouverture du canal permet aux molécules d'eau d'accéder à l'intérieur et le transfert de protons par le mécanisme de Grotthuss. Les résidus hydrophiles (en rose) stabilisent le réseau de molécules d'eau à l'intérieur du canal. La partie grise correspond aux résidus hydrophobes de la protéine. (b) Vue en coupe du canal ouvert.

Tiré de Ramsey I.S. *et al.*⁵⁸

Comme décrit au paragraphe **I.3.3** de l'introduction, ces réseaux sont surtout constitués de molécules d'eau mais les groupes acides et basiques des biomolécules en font également souvent partie. Dans les protéines ces groupes sont cruciaux car leur pKa permet de moduler la conduction protonique^{37,59}.

De plus, les protons sont généralement associés au transfert d'électrons *via* des mécanismes particuliers de transfert couplé d'électrons et de protons. Comme mentionné plus haut, ces types de transfert se produisent fréquemment en biologie (*vide supra*). Ils sont notamment au cœur des processus de conversion d'énergie.

II.1.3. Réactions de transfert couplé d'électron(s) et de proton(s) (PCET)

Il existe une grande diversité de réactions de transfert couplé électron(s)-proton(s) (PCET pour "proton-coupled electron transfer" en anglais). L'étude de ces réactions est souvent complexe : leur classification fait sans-cesse l'objet d'intenses débats dans la communauté scientifique. Cependant, deux grands groupes sont reconnus^{60,61} (**Figure A.15**), on précise que le(s) donneur(s) et accepteur(s) d'électrons et de protons ne sont pas forcément les mêmes :

- Les réactions séquentielles (notées dans la littérature ET/PT (PT/ET)) où l'électron (le proton) puis le proton (l'électron) sont transférés successivement. Ce type de réaction implique la création d'un intermédiaire réactionnel stable. De plus les transferts de l'électron et du proton se font suivant des chemins distincts. Typiquement dans les protéines, le transfert d'électrons se fait par les mécanismes (décrits précédemment) de saut ou par effet tunnel entre deux cofacteurs rédox alors que les protons sont transférés par diffusion ou *via* des chemins de conduction protonique suivant des mécanismes du type Grotthuss. Ce type de réaction est logiquement limité par la réaction de ET ou de PT la plus lente.

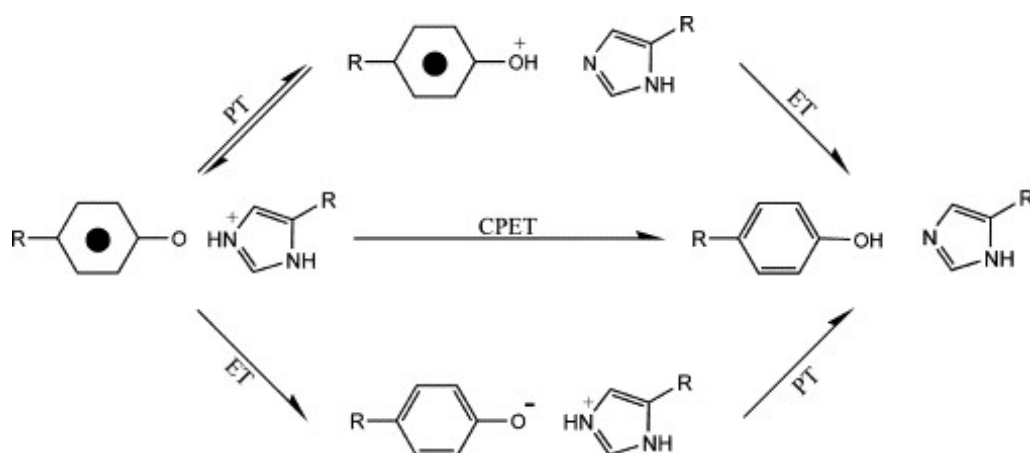


Figure A.15 : Schéma représentant les trois réactions possibles de transfert couplé d'un électron (PCET) et d'un proton pour la réduction d'une tyrosine redox active et un imidazole. Ce dernier est le donneur de proton. Deux PCET séquentielles (PT/ET ou ET/PT) et une réaction concertée (CPET) peuvent avoir lieu.

Tiré de Barry B. A.⁶²

- Les réactions concertées, appelées CPET pour "concerted proton electron transfer" en anglais ou PCET concerté. Lors d'une réaction CPET, un électron et un proton sont échangés en une seule étape, sans la formation d'état intermédiaire stable. Ces réactions relèvent de la mécanique quantique, les deux particules étant échangées par effet tunnel après recouvrement des fonctions d'onde des donneurs et accepteurs. Lors d'une réaction CPET, c'est le transfert de proton qui est limitant. Le transfert d'un proton est plus lent et ne peut se faire que sur une distance plus courte que l'électron. En effet, sa masse étant beaucoup plus élevée que celle de l'électron, la longueur d'onde de sa fonction d'onde est bien plus courte, le donneur et l'accepteur doivent donc être plus proches pour que le transfert soit possible. C'est pourquoi ce type de transfert a couramment lieu lorsque le donneur et l'accepteur de proton sont liés par liaison-H, la distance entre eux étant alors favorable à l'effet tunnel protonique⁶³. Les liaisons-H autorisent le transfert de l'électron couplé mais l'accepteur d'électron peut également être différent de celui du proton et se situer à une distance supérieure. Les réactions de CPET sont courantes en biologie, notamment dans les protéines où les structures secondaires comme les hélices- α et les feuillets- β , riches en liaisons-H, favorisent de genre de réaction⁶⁴.

A l'intérieur de ces deux catégories de réactions, il existe une multitude de "chemins" réactionnels possibles et de nombreux cas particuliers. De nombreux paramètres influencent la cinétique des réactions de PCET tels que la température, le pH, la dynamique du solvant, notamment des molécules d'eau, la distance donneur(s)-accepteur(s) et la nature de ces derniers, la polarisation des molécules, les interactions électrostatiques, le nombre d'électrons et protons transférés...⁶¹. De plus, les propriétés physico-chimiques de ces réactions sont bien souvent interdépendantes. Le chemin réactionnel d'un PCET est donc souvent très difficile à analyser et l'étude de l'influence de plusieurs de ces paramètres est nécessaire avant d'émettre une hypothèse.

Pour les réactions séquentielles, la mise en évidence de l'intermédiaire réactionnel est bien évidemment une preuve directe du type de réaction ayant lieu, mais cela n'est pas toujours possible. Un autre paramètre important est l'effet isotopique $H \Rightarrow D$ sur la cinétique des réactions. En effet, l'échange de l'hydrogène par du deutérium de taille plus importante a une grande influence sur la cinétique des réactions impliquant des protons. Ainsi les réactions présentant un ratio entre les constantes de réaction avec l'hydrogène et avec le deutérium très élevé ($> \sim 10$) sont la marque de réactions concertées⁶³. Cependant, toutes les réactions CPET ne présentent pas un ratio aussi élevé : dans ce cas il est impossible de différencier les deux types de réactions, séquentielle ou concertée, avec ce seul paramètre.

En biologie, les systèmes stabilisés par liaisons-H sont propices aux réactions de PCET. Dans les protéines, les résidus aromatiques tyrosines et tryptophane sont également souvent impliqués dans ces réactions. En effet, le groupe hydroxyle de la tyrosine et le groupe imine du tryptophane sont enclins à perdre leur proton lorsqu'ils donnent ou convoient un électron⁶⁵.

II.2. Le transport intermoléculaire

Cette thèse s'attache à l'étude du transport de charge dans des échantillons de protéines "sèches". Dans la littérature, une distinction est souvent formulée entre le transfert de charge qui désigne les mouvements de charges opérés dans une protéine dont les principaux mécanismes ont été décrits dans la section précédente (Introduction, II.1), et le transport de charges décrivant le flux de charges à travers un échantillon multimoléculaire. Cette distinction est reprise dans ce paragraphe.

II.2.1. La caractérisation électrique des matériaux biologiques

Les études du comportement électrique et des mécanismes de transport dans les matériaux biologiques sont réalisées avec des échantillons purifiés, dans un environnement aqueux ou sec et à différentes échelles allant de l'échelle nanométrique (taille d'une protéine) à l'échelle macroscopique (taille de l'échantillon). En effet, les échantillons peuvent être composés d'une seule molécule (par exemple un nano-fil bactérien ou un brin d'ADN isolé) ou sous la forme de poudres compressées, gels, films, composés d'un grand nombre d'exemplaires de la molécule d'intérêt. Les études en environnement aqueux peuvent comprendre des méthodes spectroscopiques (fluorescence, radiolyse impulsionnelle...) ou électrochimiques (voltamétrie cyclique, spectroscopie d'impédance électrochimique...)⁶⁶. Les études menées sur des échantillons secs consistent à mesurer la conduction électrique à travers les échantillons.

L'échelle considérée dans ces investigations est bien plus importante que celle du transfert de charges dans les protéines. Les processus préalablement décrits ne suffisent pas à expliquer entièrement le transport de charges à des échelles micronique jusqu'à macroscopique. En effet, en plus des mécanismes de transfert de charges intramoléculaires, les mécanismes de transfert intermoléculaires sont capitaux. De plus, la force motrice entraînant le mouvement des charges n'est plus un potentiel redox entre un centre donneur et un centre accepteur espacés de quelques angströms à quelques dizaines d'angströms seulement mais un champ électrique homogène appliqué entre des électrodes séparées par des gaps micro- voire macroscopique qui jouent le rôle de réservoirs de charges⁵¹. Les processus de transport sont alors souvent limités par la capacité d'injection de charges des électrodes dans le matériau.

L'hétérogénéité des méthodes de caractérisation et de mesures ainsi que des méthodes de préparations des échantillons (géométrie, contact avec les électrodes) ou encore la variabilité des conditions ambiantes (température, humidité) sont à considérer pour expliquer les différences entre les résultats décrits dans la littérature.

II.2.2. Transport d'électrons

Amdursky et al⁶⁶ décrivent que les protéines peuvent être considérées comme des matériaux semi-conducteurs organiques avec de bonnes propriétés de conduction comparée à d'autre

molécules organiques. En effet, les protéines seraient de meilleurs conducteurs que les polymères saturés, semi-conducteurs à très grand gap (typiquement 7-8 eV), mais moins performants que polymères π -conjugués (gap < 3 eV). Les mécanismes de transport de charges, notamment d'électrons, à travers des échantillons de protéines secs sont actuellement moins bien compris que les mécanismes de transfert de charge intra-protéine. Cependant, les modèles les plus couramment partagés et décrivant ces phénomènes s'appuient sur ceux du transfert de charges⁵¹.

Le transport d'électrons sur des distances égales ou supérieures à plusieurs dizaines de nm implique la présence de centres électro-actifs (typiquement des centres redox) régulièrement répartis au sein de l'échantillon pour offrir des sites électroniques localisés disponibles³. Le passage d'un électron à travers le matériau s'effectue selon deux modèles analogues à ceux du transfert d'électron dans les protéines : par effet tunnel ou par saut. Cependant, l'effet tunnel ne peut se produire qu'à basse température (< 150-200 K)⁶⁶. L'essentiel des mesures étant réalisées à température ambiante ou au-delà, les modèles de saut ou de saut à distance variable sont de préférence invoqués^{28,66}. Les électrons transitent alors successivement sur des "relais" avant d'atteindre la cathode. Le passage entre deux relais successifs se fait grâce à un effet tunnel. Contrairement au transfert d'électron au sein d'une protéine, il n'existe pas une seule voie permettant le passage de ces charges mais de multiples chemins possibles entre les deux électrodes conductrices.

II.2.2 i) Rôle des structures aromatiques : Empilement π par interaction de van der Waals (π - π stacking)

Les structures aromatiques jouent souvent un rôle fondamental dans les mécanismes de conduction électronique des matériaux organiques. Comme décrit au paragraphe II.1.1 de l'introduction, les résidus aromatiques facilitent les mécanismes par saut d'électrons. De plus, les (hétéro)cycles aromatiques peuvent établir entre eux des interactions non-covalentes particulières (interactions de van der Waals) dont plusieurs configurations géométriques existent⁶⁷ (**Figure A.16**). La portée de ce type d'interaction est comprise entre 2 et 5 Å, avec une valeur de type de ca. 3.6 Å entre deux noyaux benzéniques co-faciaux.

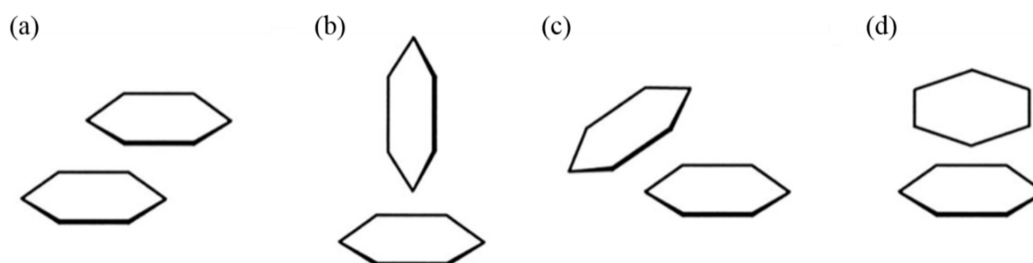


Figure A.16 : Exemples de géométries possibles d'empilement π entre deux noyaux aromatiques : (a) parallèle décalée, (b) en T, (c) parallèle décalé et (d) en géométrie de type arête de poisson (herringbone). Dans les protéines, la configuration (a) est la plus courante. Tiré de Gazit E.⁶⁸

Ces interactions sont importantes en biologie car elles participent à la stabilisation de structures supramoléculaires auto-assemblées telles que les brins d'ADN ou certaines fibres amyloïdes⁶⁸. Une de leurs particularités est qu'elles autorisent une délocalisation électronique entre les centres aromatiques successifs. Dans ce cas de figure un transport d'électron par délocalisation électronique à la manière des mécanismes de conduction observés dans les polymères π -conjugués (semi-conducteurs) et conducteurs électronique peut avoir lieu.

II.2.3. Importance du rôle de l'eau

L'eau n'est pas qu'un simple solvant pour les molécules biologiques, et en particulier pour les protéines, mais joue un rôle central dans les processus biologiques. Une particularité de l'eau est que c'est une molécule polaire capable de former des amas structurés plus ou moins étendus, notamment à la surface des molécules solvatées, en établissant des liaisons hydrogènes dans quatre directions, ce qui lui confère des propriétés uniques^{38,69}. Toujours plus d'exemples viennent souligner l'action de l'eau dans les mécanismes d'assemblage, de stabilisation et de dynamique de complexes biomoléculaires (elle dirige notamment les processus d'auto-assemblage des protéines), dans les interactions intermoléculaires, dans les mécanismes de transport et de diffusion des molécules ou encore dans la conduction ionique, protonique et électronique⁷⁰. En particulier, l'eau a un effet considérable sur la conductivité d'un grand nombre de matériaux biologiques et affecte aussi bien la conduction d'électrons que de protons⁷¹. Ce fait doit être considéré même dans le cas des protéines "sèches" puisque celles-ci retiennent toujours les molécules d'eau essentielles au maintien de leur structure secondaire⁶⁶.

Concernant la conduction d'électrons, l'eau facilite les réactions de ET⁷² et joue très souvent le rôle de médiateur dans les réactions de PCET qui sont aussi un moyen de transfert intermoléculaire important. Par exemple, des "ponts" d'eau structurée peuvent se former entre deux molécules proches facilitant ainsi le passage des électrons entre donneur et accepteur par effet tunnel. Finalement, la présence d'eau permet d'abaisser l'énergie d'activation nécessaire au transport d'électron par saut au sein du matériau⁷³. Par ailleurs, la présence de molécules d'eau affecte bien évidemment la conduction de protons. Comme décrit au paragraphe II.1.2 de l'introduction, le transfert de protons est un processus assisté par les molécules d'eau et surtout le transport de protons sur de grandes distances intra- et intermoléculaires nécessite l'existence de passages continus formés de molécules d'eau permettant la diffusion ou le mécanisme de Grotthuss. Ainsi, il est possible qu'à partir d'un seuil d'hydratation, des réseaux de molécules d'eau suffisamment denses soient formés pour permettre la conduction de protons. Ce phénomène est décrit par la théorie de la percolation^{74,75}.

II.2.3. i) Théorie de la percolation

Le modèle de percolation est une approche générale statistique s'appliquant bien aux systèmes désordonnés composés d'éléments connectés entre eux au hasard. Par exemple, dans le cas de la conduction de protons dans les matériaux constitués de protéine, les échantillons sont constitués d'éléments conducteurs (clusters de molécules d'eau) isolés au sein d'une

matrice isolante. En augmentant le nombre d'éléments conducteurs, soit la quantité d'eau au sein de l'échantillon, le nombre de liaisons de percolation entre ces éléments augmente (**Figure A.17**). La théorie de la percolation prédit un seuil de concentration d'éléments conducteurs à partir duquel la conduction survient puis augmente avec l'augmentation de la concentration selon une loi de puissance⁷⁴.

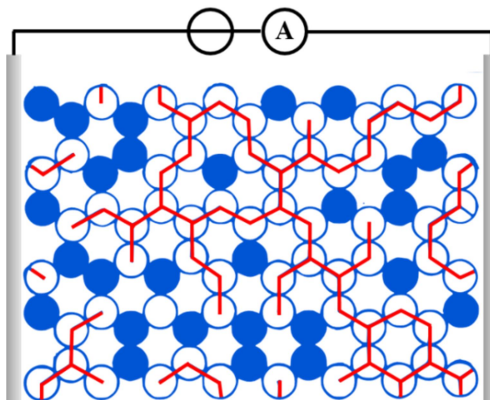


Figure A.17 : Illustration de la théorie de la percolation dans un système composé d'éléments conducteurs (ronds vides) au sein d'une matrice isolante (ronds pleins). L'augmentation du nombre d'éléments conducteurs permet l'extension des voies de percolation (en rouge) via lesquelles des charges peuvent être transférer entre les deux électrodes.

Adapté de Efros A. L.⁷⁶

II.3. Les matériaux semi-conducteurs biologiques

II.3.1. Les pilis et nano-fils bactériens, conducteurs naturels

Les pilis et nano-fils bactériens sont les seuls matériaux biologiques montrant une haute conductivité électrique dans la nature. Plusieurs micro-organismes produisent des filaments conducteurs à la surface de leur membrane pour transférer des électrons au milieu extérieur⁷⁷ comme *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis* MR-1 (**Figure A.18 (a)**), les deux principales bactéries étudiées.

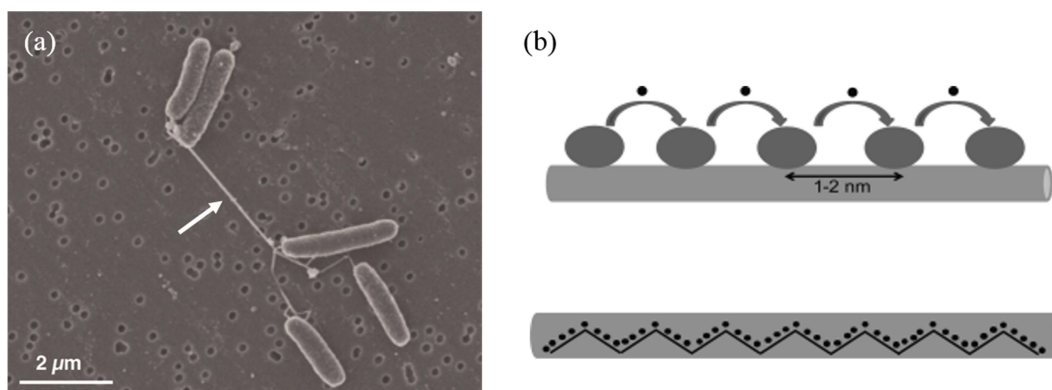


Figure A.18 : (a) Image par microscopie électronique à balayage de bactéries *Shewanella oneidensis* MR-1 où un nano-fil est visible (flèche blanche). Ces microorganismes se servent de ces derniers pour échanger des électrons. (b) Représentation des deux modèles proposés pour décrire le mécanisme de

conduction électronique le long des pilis de *Geobacter sulfurreducens*. Selon le premier (haut), les électrons sautent de cytochromes en cytochromes répartis le long de la fibre. Pour que le mécanisme de saut puisse avoir lieu, la distance entre deux centres successifs ne doit pas excéder 1-2 nm. L'autre mécanisme (bas) décrit un transfert d'électrons par délocalisation tout le long du nano-fil conduisant à une conduction de type "métallique".

Tiré de Gorby Y. A. *et al.*⁷⁷ (a) et Malvankar N. S. & Lovley D. R.⁷⁸ (b)

Geobacter synthétise des nano-fils, appelés pilis, de diamètre de *ca.* 3 à 5 nm pour une longueur de *ca.* 10 à 20 μm résultant de l'assemblage de protéines, principalement la piline. Une conductivité électronique de σ_{dc} de 5 mS.cm^{-1} a été mesurée (de manière *in situ*) pour des réseaux de pilis secs sur plusieurs centimètres de long⁷⁹. La structure des nano-fils produits par *Shewanella* est beaucoup moins bien connue mais l'on sait qu'ils comportent des cytochromes dans une proportion qui fait encore débat⁸⁰. El-Naggar *et al.*⁸⁰ ont mesuré une conduction électrique efficace à l'échelle du micromètre avec une résistivité de *ca.* $10^{-2} \Omega.\text{cm}$.

Les mécanismes de transport d'électrons le long de ces nano-fils bactériens font encore débat (**Figure A.18 (b)**). Le mécanisme de saut entre cytochromes a été proposé pour *Shewanella* mais il n'a pas encore été démontré que la densité de cytochromes soit suffisante⁸¹. Pour *Geobacter*, Malvankar et Lovley proposent un modèle de conduction de type "métallique" selon lequel les électrons seraient transportés par délocalisation le long des groupements aromatiques en interaction π tout le long des fibres. Le débat fait rage : d'autres auteurs montrent notamment que le comportement électrochimique des films de biofilms de *Geobacter* est incompatible avec une conduction métallique et correspond plutôt à une conduction basée sur des réactions redox en série⁸².

II.3.2. Protéines et autres matériaux biologiques

Des études ont été menées à partir de la seconde moitié du XX^{ème} siècle sur les propriétés de conduction d'échantillons biologiques sous forme de poudre sèche, en particulier des protéines redox comme l'hémoglobine avec les travaux de Rosenberg B.⁷³, et les pigments de mélanines (composés cycliques dérivés de l'acide aminé tyrosine formant des agrégats) avec les travaux de McGuinness J.⁸³. Ceux-ci avancent que ces composés ont un comportement électrique observant la loi de Mott-Davis qui décrit le comportement des matériaux semi-conducteurs électroniques amorphes et notent une grande sensibilité à l'humidité. Par conséquent, ils classent ces matériaux comme conducteurs mixtes avec une conduction électronique intervenant à basse humidité et une conduction protonique devenant dominante à partir d'un certain seuil d'humidité selon la théorie de la percolation. Des travaux plus récents de Meredith P.⁸⁴ remettent en question le caractère semi-conducteur amorphe de la mélanine mais suggèrent toujours que ce matériau soit un conducteur mixte ionique/électronique.

L'ADN est une autre molécule biologique emblématique qui a très tôt suscité l'attention de la communauté scientifique en raison de sa structure de double hélice au sein de laquelle les cycles aromatiques des bases nucléiques sont empilés régulièrement avec une distance de séparation de 3,4 Å. Cette structure est stabilisée grâce à des liaisons-H et des empilements π (interactions de van der Waals) entre les nucléobases ce qui laisse espérer une possibilité de transport électronique. Eley et Spivey décrivent dès 1962 un comportement électrique typique

des semi-conducteurs pour des échantillons d'ADN double brin secs, avec un gap d'environ 2,4 eV. Ils déduisent de leur étude de la conduction en fonction de la température que le processus de transport intervenant est thermiquement activé et que les charges passent par les bases azotées le long des brins⁸⁵. Plus de 50 ans après ces premiers résultats, les débats concernant les mécanismes de conduction électrique de l'ADN demeurent importants. L'hypothèse de l'existence d'une conduction d'électrons sur de longues distances, supérieures à quelques dizaines de nanomètres, via le réseau de liaisons-H et d'interactions π le long de la structure de l'ADN reste très controversée⁸⁶. En effet, plusieurs équipes préfèrent expliquer la forte dépendance de la conduction de l'ADN vis-à-vis de l'humidité par l'établissement d'une conduction protonique dans la couche d'eau adsorbée à la surface des brins d'ADN^{87,88}.

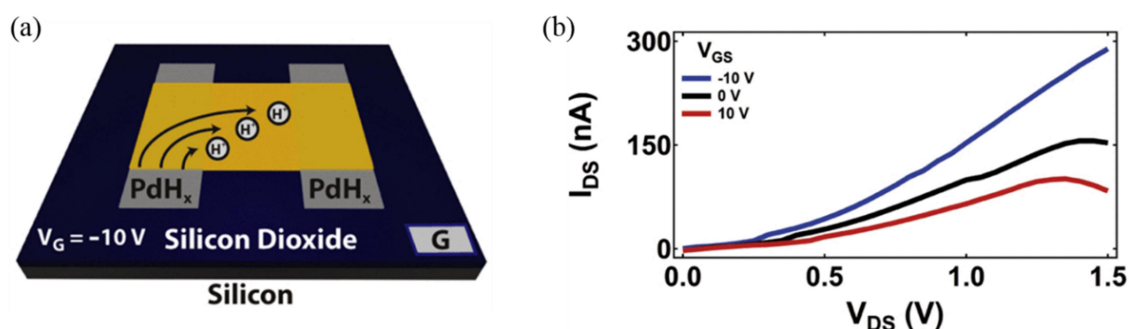


Figure A.19 : (a) Schéma d'un transistor à effet de champ protonique basé sur les propriétés de conduction protonique d'un film de protéine réflectine (en jaune). Les électrodes drain et source (en gris) sont en palladium hydride permettent d'injecter des protons dans le matériau. (b) Evolution du courant drain-source (I_{DS}) en fonction de la tension source-drain (V_{DS}) mesuré avec le dispositif (a) pour différentes valeur de tension de polarisation de la grille (V_{GS}).

Adapté de Ordinario D. D. *et al.*⁸⁹

Enfin, depuis une petite dizaine d'années, les propriétés de conduction de protons de certaines protéines ont été clairement démontrées et exploitées. Par exemple, la forte capacité de films d'albumine, une protéine extraite du blanc d'œuf, à conduire les protons a été exploitée pour la conception d'une synapse artificielle. L'albumine servait d'interface entre la partie organique et inorganique du dispositif⁹⁰. Des transistors protoniques à effet de champ ont également été conçus dans lesquels le matériau actif peuvent être des protéines, comme la réflectine utilisée par le groupe de Gorodetsky^{89,91} (protéine produite par les cellules de la peau des céphalopodes et formant des plaquettes par auto-assemblage), ou des polymères biologiques comme des polysaccharides, étudiés par le groupe de Rolandi³² (**Figure A.19**). A chaque fois, le mécanisme de conduction proposé est le transport de protons par le mécanisme de Grotthuss.

II.3.3. Les fibres amyloïdes

Les propriétés de conduction intrinsèque des fibres amyloïdes, ont été peu étudiées. La plupart des mesures électriques ont été effectuées dans le cadre de la caractérisation de matériaux composites où les fibres amyloïdes, considérées comme isolantes, sont exploitées pour leur

propriétés d'auto-assemblage et pour leurs structures fibrillaires robustes qu'il est possible d'hybrider avec des molécules conductrices (cf. Introduction, **III.2.2**). Dans ces études, les fibres amyloïdes non modifiées jouent le rôle de témoin négatif avec des valeurs de conduction largement en deçà des constructions hybrides. Leurs caractérisations n'ont donc pas nécessairement été effectuées dans les conditions optimales pour des matériaux biologiques et sont souvent incomplètes. Les conductivités électriques mesurées pour les fibres amyloïdes non fonctionnalisées sont très disparates et peu comparables à cause de l'éclectisme des méthodes de mesures employées : choix de la géométrie du dispositif de mesure, du matériau des électrodes, état de l'échantillon (fibre unique, câbles ou structure multifibres, films...). De plus, les conditions de température et d'humidité sont rarement précisées alors que ces paramètres ont une influence prédominante sur la conduction des matériaux biologiques.

Entre autres mesures, Sheibel *et al.* relèvent *via* une mesure courant-tension (I - V) entre 0 et 20 V une très grande résistance de l'ordre de 10^8 M Ω pour des fibres formées par la protéine Sup35p déposées aléatoirement entre des électrodes d'or de gap compris entre 2 et 10 μm , et par conséquent les classent comme isolantes⁹². Lors d'une expérience de manipulation de fibres amyloïdes par électrophorèse, Castillo *et al.*⁹³ attribuent aussi un comportement électrique isolant pour des nanotubes formés par le petit peptide composé de deux phénylalanines (FF), acides aminés aromatiques qui constituent l'élément de reconnaissance du cœur des fibres amyloïde A β . La caractéristique I - V de ces nanotubes placés individuellement entre des électrodes d'or séparées de 1 μm montre une conduction ohmique (I - V linéaire) entre 0 et 3 V avec des courants faibles, inférieurs à 2,5 pA à 3V.

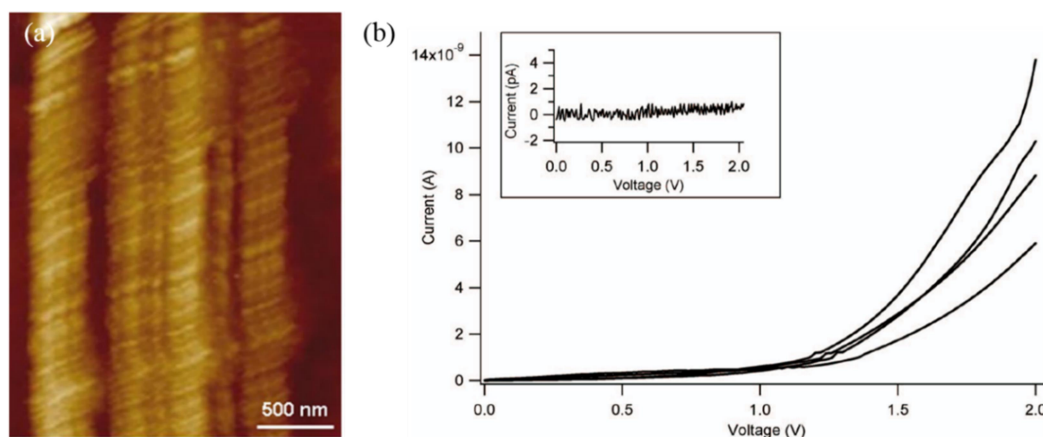


Figure A.20 : (a) Image de microscopie à effet tunnel de fibres de protéines formées par le peptide poly(VGGLG) déposées sur un substrat en or et (b) caractéristique I - V typiques de ces fibres déposées sur des électrodes d'or inter-digitées. La mesure contrôle du dispositif vide est montrée en insert.

Adapté de Del Mercato L.L. *et al.*⁹⁴

Dans une autre étude, Del Mercato *et al.*⁹⁴ mesurent une conduction électrique d'environ 10 nA à 2 V pour des fibres formées par le polypeptide poly(VGGLG), un dérivé de l'élastine (**Figure A.20 (a)**). Celles-ci étaient déposées aléatoirement à raison de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ sur des électrodes d'or inter-digitées de gap 2 et 10 μm (surface active $400 \times 500 \mu\text{m}^2$). Ils attribuent

cette conduction à un transport de protons du fait de la forte dépendance de la conductivité de ces fibres par rapport à l'humidité. Domingan *et al.*⁹⁵ enregistrent également des courants de l'ordre de grandeur de la dizaine de nA dans des fibres amyloïdes d'insuline bovine entre 0 et 2 V formant un réseau sur des électrodes inter-digitées en or de gap 3 μm (surface active 400 x 200 μm^2). Ils se réfèrent à Del Mercato *et al.* pour expliquer l'origine de cette conduction électrique. Pour ces deux études, les caractéristiques *I-V*, réalisées entre 0 et 2 V, étaient similaires. Celles-ci ne présentaient pas une conduction ohmique mais un comportement présentant deux régimes: une conduction faible et quasi-constante (< 2 nA) entre 0 et 1-1,5 V puis une augmentation exponentielle passé ce seuil (**Figure A.20 (b)**).

Enfin, plusieurs équipes s'inspirent des séquences de protéines amyloïdes pour développer des fibres conductrices constituées de protéines de synthèse. Il s'agit souvent de peptides impliqués dans la formation du cœur de la structure de fibres amyloïdes, auxquels des modifications sont apportées par mutations génétiques (insertions ou substitutions) dans le but d'introduire des résidus aromatiques. Par exemple, Creasey *et al.*⁹⁶ ont construit le peptide GFPRFAGFP comportant trois phénylalanines (F) et inspiré des protéines formant des fibres d'élastine et de collagène. Ces fibres possèdent une conduction ohmique entre 0 et 2 V. Les courants enregistrés à 2 V sont d'environ 35 pA. Les auteurs suggèrent qu'une conduction électronique s'établit le long des fibres et suggèrent une forte implication des résidus aromatique et des interactions π dans le mécanisme de conduction. Ces mesures électriques ont été réalisées sur des films de fibres de concentration en protéine 10 mg.ml^{-1} entre deux électrodes de molybdène de gap 1 mm, dans les conditions atmosphériques de la pièce (température 25°C et humidité relative 50-60 %). Amit *et al.*⁹⁷ montrent pour leur part que le remplacement des deux phénylalanines du peptide VLKAAFF dérivé de la protéine amyloïde A β par les deux résidus non naturel également aromatiques 2-thienylalanine améliore la conduction des fibres. Ils n'écarteront pas l'hypothèse d'une conduction électronique *via* ces aromatiques, notamment à basse humidité, cependant, ils suggèrent aussi qu'une conduction de proton devienne dominante à haute humidité. En effet, une influence conséquente de l'humidité sur la conduction de ces fibres est notée. La caractéristique *I-V* reportée entre 0 et 1 V, est linéaire et le courant enregistré à 1 V et 80 % d'humidité relative est d'environ 10 nA. Ces mesures ont été réalisées sur des films de fibres de concentration 0,3 mM formant un réseau entre deux électrodes d'or de gap 20 μm .

Pour conclure, tous les matériaux biologiques testés présentent des propriétés de conduction électrique qualifiées soit d'isolantes soit de semi-conductrices. Elles sont surtout très sensibles à l'humidité. S'il est maintenant admis qu'une conduction protonique ait lieu à partir d'un seuil d'hydratation²⁸, la possibilité d'une conduction électronique sur de grandes distances (micromètre et au-delà) au sein de ces matériaux est toujours très débattue. Toutefois, l'exemple du transfert d'électrons sur plusieurs dizaines de micromètres par certaines bactéries via leurs pilis montre que cette hypothèse est fondée. Une difficulté pour ces études est la présence d'eau adsorbée et d'eau de structure, notamment dans les protéines, qu'il est impossible d'éliminer totalement, rendant la discrimination entre les effets électriques intrinsèques au matériau et ceux dus à l'eau difficile⁹⁸. De plus, dans l'éventualité de

processus hybrides, les contributions ioniques et électroniques ne peuvent être considérées séparément puisque ces deux types de conduction s'influencent mutuellement⁹⁹.

III- Les fibres amyloïdes

Les fibres amyloïdes sont des nanostructures fibrillaires très stables formées par un mécanisme d'auto-assemblage spontané de protéines. Une très grande diversité de protéines naturelles et de polypeptides de synthèse possèdent une propension à former ces organisations supramoléculaires. Il a d'ailleurs été proposé que cela constitue une propriété universelle des protéines¹⁰⁰. Cependant, quelle que soit la protéine incriminée, ces fibres partagent le même type de structure en feuillets- β . Ces agrégats ordonnés ont été découverts et étudiés depuis la moitié du XIX^{ème} siècle dans le cadre de certaines pathologies, notamment les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Creutzfeldt-Jakob...), où des protéines normalement solubles se replient mal et s'agrègent pour former des dépôts amyloïdes insolubles qui s'accumulent dans les organes et tissus en y perturbant leur fonctionnement. Ce phénomène concerne également de nombreux autres organes que le système nerveux central tels que le cœur, les reins, le système endocrinien, la peau, les yeux...¹⁰¹. Néanmoins, on sait depuis quelques années qu'il existe aussi des fibres amyloïdes non toxiques et fonctionnelles impliquées dans divers processus physiologiques chez de nombreux organismes ainsi que chez l'homme¹⁰². Par exemple, des fibres amyloïdes formées par la protéine Pmel17 participent au processus de synthèse de la mélanine^{102,103}. Ce type de structure est également un des constituants majeurs des biofilms et matrices extracellulaires synthétisés par certaines bactéries. On les rencontre encore dans la composition de la soie d'araignée ou dans le ciment des crustacés de la famille des Cirripèdes... Enfin, depuis quelques années, les propriétés remarquables des fibres amyloïdes découvertes dans ces contextes originels génèrent un intérêt croissant pour le domaine des bio-nanotechnologies. L'étude de leur structure, leurs propriétés et les mécanismes d'assemblage/de désassemblage est donc essentielle si de tels transferts technologiques sont envisagés et recherchés.

III.1. Formation et structure

Malgré quelques décennies d'études, les mécanismes de formation des fibres amyloïdes sont encore largement discutés et débattus dans la communauté scientifique. Il est néanmoins admis qu'ils suivent un processus de nucléation-élongation¹⁰⁴ (**Figure A.20**). Une protéine amyloïde acquiert une structure secondaire riche en brins- β qui s'associent via des liaisons-H pour former des feuillets- β . Après une phase de nucléation correspondant à l'amorçage de la réaction de fibrillation, l'élongation des protofibres est rapide. Les sous-unités protéiques (monomères ou oligomères), strictement identiques, s'auto-agrègent par empilements successifs des brins- β perpendiculairement à l'axe d'élongation de la fibre. La structure est stabilisée par un réseau dense de liaisons-H ayant une orientation parallèle à l'axe fibrillaire.

Enfin, généralement plusieurs protofibres s'associent latéralement pour former une fibre amyloïde mature.

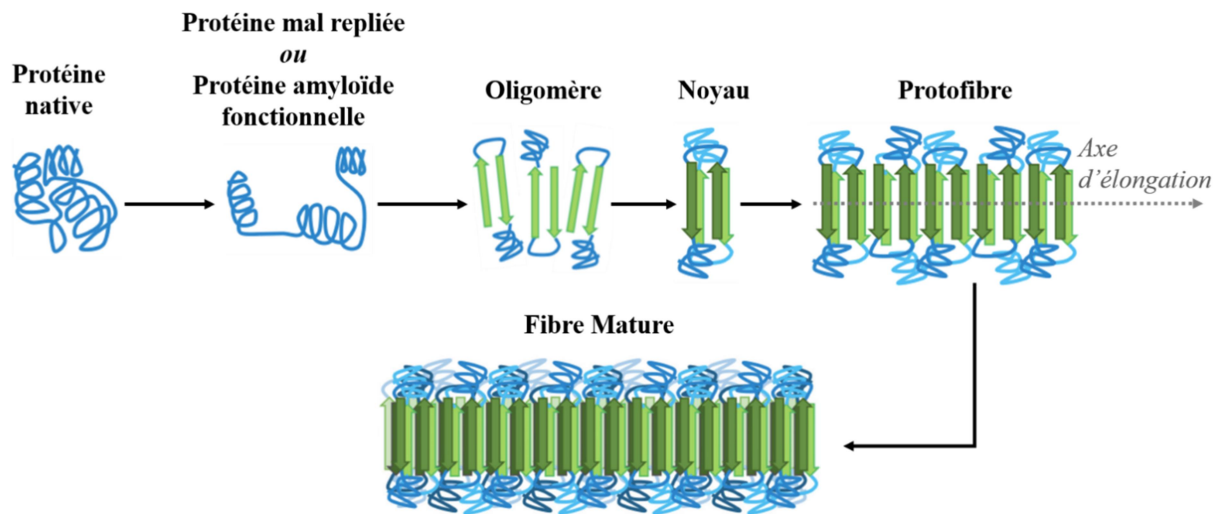


Figure A.20 : Schéma décrivant le principe général du mécanisme d'auto-assemblage des fibres amyloïdes. Adapté de Kaminski C.F. & Kaminski G.S.¹⁰⁴

En dépit de cette structure commune en feuillets- β s'étendant sur des centaines de sous-unités protéiques, il existe de grandes différences d'assemblage, et donc d'aspect d'une fibre à l'autre, suivant la protéine impliquée. Ce polymorphisme peut également concerner une même protéine. Ceci peut s'expliquer par une variation de constitution au niveau atomique, d'une différence de repliement au niveau moléculaire notamment dans l'association des brins- β au sein de la protéine, ou par la diversité d'associations possibles inter-fibres¹⁰⁵ (**Figure A.21**). De plus, la formation des fibres amyloïdes est extrêmement dépendante de paramètres extérieurs, en particulier du pH et de la force ionique du tampon, de la concentration de protéines, de la présence d'autres molécules ou encore des paramètres de température et d'agitation, qui peuvent conduire à des cinétiques de fibrillation et organisations différentes^{106,107}. Le contrôle de ces conditions physico-chimiques est donc capital.

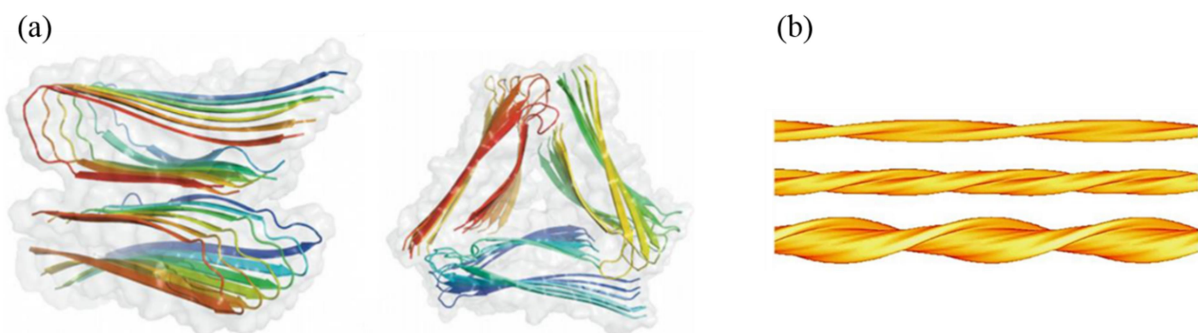


Figure A.21 : Représentation du polymorphisme des fibres amyloïdes. Le polymorphisme peut provenir : (a) d'interactions différentes entre les feuillets- β de monomères, ici du peptide amyloïde A β ₄₀. Ces oligomères constituent les briques de base de deux fibres amyloïdes morphologiquement différentes. (b) D'associations latérales hétérogènes une fois les fibres amyloïdes formées.

Adapté de Lemkul J.A. & Bevan D.R.¹⁰⁸ (a) et de Jiménez J.L. *et al.*¹⁰⁹ (b)

Des techniques d'imagerie telles que la microscopie à force atomique (AFM) ou à la microscopie électronique à transmission (TEM) ont permis de caractériser la structure macromoléculaire des fibres amyloïdes^{110,111,110,109,108}. Celles-ci ont un diamètre typiquement compris entre 5 et 20 nm et peuvent avoir des longueurs très variables de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs microns. Elles présentent une hélicité de pas variable et la plupart du temps ne sont pas ramifiées. Leur structure à l'échelle atomique est plus compliquée à étudier du fait de leurs grandes dimensions et de leur organisation non cristalline rendant l'utilisation de la diffraction des rayons-X ou de la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) complexe. De plus, ces techniques demandent une grande quantité et homogénéité d'échantillon (sans polymorphisme), ce qui est très difficile à produire pour la plupart des fibres amyloïdes. Néanmoins, des clichés de diffraction des rayons-X ont pu être réalisés pour diverses fibres de synthèse ou naturelles. Les clichés de diffraction révèlent des similarités, qui ont permis de d'extraire des caractéristiques génériques^{112,113} (**Figure A.22**).

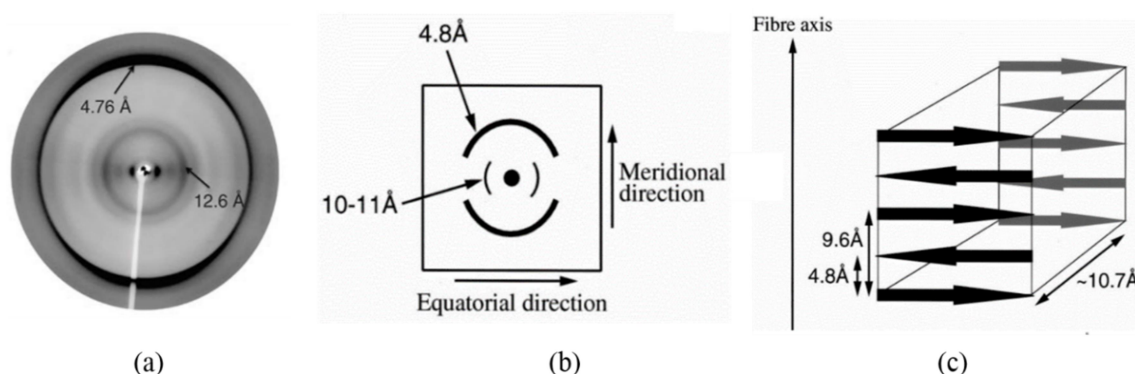


Figure A.22 : (a) Cliché de diffraction des rayons-X obtenue avec des fibres amyloïdes formées par le peptide HYFNIF où les anneaux de diffractions typiques des fibres amyloïdes sont indiquées par des flèches. (b) Représentation schématisée des caractéristiques communes des figures de diffraction aux rayons X des fibres amyloïdes. Les réflexions à environ 10 Å selon l'axe équatorial et à 4,8 Å selon l'axe méridional correspondent respectivement à la distance entre feuillets- β et à la distance entre deux brins- β empilés au sein d'un feuillet- β . Cette structure générique des fibres amyloïdes est représentée sur le schéma (c).

Adaptée de Maurer-Stroh S. *et al*¹¹⁴ (a) et de Serpell L.C.¹¹² (b) et (c)

Les clichés de diffraction présentent deux réflexions à 4.8 Å et à 10-12 Å suivant l'axe méridional et l'axe équatorial respectivement. Ces profils révèlent que le cœur structurant des fibres amyloïdes est hautement périodique et composé de feuillets- β dont les brins- β , perpendiculaires à l'axe des fibres sont séparés de 4.8 Å (réflexion méridionale). La réflexion équatoriale d'une dizaine d'Angström caractérise la distance entre les feuillets- β adjacents et peut-être assez variable d'une fibre à l'autre, l'interaction entre ces feuillets dépendant de leur nombre et de leur composition en acides aminés.

Plus récemment, des expériences de diffraction des rayons X ont permis de résoudre les structures jusqu'au niveau atomique avec la conformation des chaînes latérales de quelques fibres amyloïdes courtes, capable de cristalliser, et constituées de petits peptides de synthèse jusqu'à une dizaine de résidus^{115,116}.

Cependant, le recours à la spectroscopie RMN à l'état solide haute résolution (SS-NMR) reste nécessaire pour l'étude de structures amyloïdes de plus grande complexité. Cette méthode présente également l'avantage de se passer de la cristallisation des échantillons pouvant affecter la structure des fibres naturellement en milieu aqueux. De cette manière la structure haute résolution de fibres amyloïdes formées de peptides plus importants comme le peptide K3 de la β_2 -microglobuline (impliqué dans des formes d'insuffisances rénales)¹¹⁷, du peptide A β_{1-42} (impliqué dans la maladie d'Alzheimer)¹¹⁸ ou encore de HET-s(218-289) (protéine fonctionnelle de champignon)¹¹⁹ ont été établies. Ces expériences ont confirmé la structure commune en feuillets- β et le fait que l'agencement des feuillets les uns par rapport aux autres variait en fonction de la fibre étudiée.

III.2. Propriétés des fibres amyloïdes

III.2.1. Propriétés générales et intérêt pour les biotechnologies

Les fibres amyloïdes font l'objet d'un grand intérêt du fait de leur implication dans des pathologies répandues mais aussi en tant que matériaux particulièrement attrayant pour les biotechnologies. En effet, les fibres amyloïdes possèdent des propriétés remarquables :

- Auto-assemblage et fonctionnalisation : La formation des fibres amyloïdes s'effectue sans apport d'énergie extérieure et à température ambiante via un mécanisme d'auto-assemblage par approche ascendante (ou "bottom-up") *i.e.* une fibre, ou multimère, est formée par apport successif de sous-unités monomère. Ce mécanisme autorise de surcroît l'autoréparation des fibres en cas de rupture de liaisons, celles-ci pouvant se reformer pour retrouver leur état fonctionnel¹²⁰. De plus, le fait que de nombreuses protéines et peptides puissent former des structures amyloïdes *in-vitro* offre un large choix de séquences peptidiques et de manipulations pour obtenir les fibres de dimensions et compositions chimiques recherchées¹²¹. Les séquences peptidiques sont en effet facilement modifiables par des techniques d'ingénierie biologique permettant de moduler leurs propriétés ou encore de créer des chimères¹²². Les fibres amyloïdes sont également fonctionnalisables *a posteriori*. En effet, leurs chaînes latérales contiennent différents groupements chimiques tels que NH₂, COOH, SH etc... qui permettent leur modification par voie chimique (interactions covalentes ou non-covalentes) avec des molécules biologiques ou chimiques, organiques ou inorganiques¹²³. Leur fort rapport surface/volume (quelques nm de diamètre pour plusieurs μ m de long) leur offre une grande surface d'interaction et des possibilités de fonctionnalisations efficaces. De plus, étant donné qu'elles sont composées de la répétition d'un même monomère protéique, les groupes fonctionnalisés se retrouvent répartis régulièrement et avec une périodicité très fiable tout le long des fibres.

- Stabilité et caractéristiques mécaniques : La grande robustesse des fibres amyloïdes est expliquée par leur réseau étendu de liaisons-H stabilisant les interactions intra et inter-

moléculaires. Une fois formées, les fibres sont extrêmement stables même dans des conditions extrêmes de pH, force ionique, température, pression, voir même d'exposition aux UV. Elles peuvent aussi être déshydratées sans perdre leur structure et sont résistantes à la dégradation par les protéases. De plus, même si les fibres amyloïdes sont stabilisées par des liaisons "faibles" et qu'elles possèdent un facteur de forme important comme décrit plus haut, elles ont une rigidité proche de celle des polymères ioniques avec des longueurs de persistance comparables (voire supérieures), ainsi que d'excellentes propriétés mécaniques. Celles-ci ont été étudiées par des méthodes de caractérisation nano-mécaniques appropriées (e.g. manipulation mécanique par AFM, diffraction des rayons X sous pression contrôlée...) et d'analyse statistique des fluctuations géométriques pour plusieurs fibres¹²⁴. Les fibres amyloïdes sont parmi les matériaux non covalents les plus résistants avec des valeurs de module d'Young compris entre 0.2 et 14 GPa et un module d'élasticité de l'ordre du GPa, c'est-à-dire des valeurs comparables à celles mesurées pour des matériaux extracellulaires comme le collagène, la kératine ou la soie.

- Autres propriétés physiques : Parmi les propriétés intrinsèques des fibres amyloïdes, on peut noter l'existence d'une polarité électrique selon leur axe ce qui rend possible leur manipulation par des champs électriques¹²⁵. Ces molécules chirales sont optiquement actives ce qui permet de les identifier par dichroïsme circulaire (CD). Ces fibres montrent également une biréfringence sous lumière polarisée. Enfin, l'observation *in vitro* d'une fluorescence bleue imputée aux fibres amyloïdes a assez récemment été reportée^{126,127}. L'explication de ce phénomène n'a pas encore été définitivement établie. Différentes hypothèses sont proposées dans la littérature: effets de confinement quantique, génération d'états excités dû aux unités (hétéro)aromatiques^{126,128} présent dans leur structure etc.... Cependant, cette luminescence a aussi été observée dans le cas de fibres dénuées de résidus (hétéro)aromatiques, ce qui a mené certains auteurs à proposer le concept d'une délocalisation électronique au sein du réseau de liaison-H¹²⁹ qui générerait un semi-conducteur bio-organique à (très) grand gap (>4eV) capable d'émettre des photons dans cette gamme de longueur d'onde.

Ces capacités d'auto-assemblage et de multi-fonctionnalisation couplées à de bonnes qualités mécaniques en font ainsi des matériaux de choix pour diverses applications en biotechnologies et nanotechnologies^{110,130}. A fur et à mesure de leur découverte dans la nature, leurs rôles fonctionnels sont sources de bioinspiration pour l'ingénierie de biomatériaux fonctionnels. Par exemple, des adhésifs résistants à des conditions extrêmes, comme l'immersion dans l'eau, et programmés pour adhérer à des substrats spécifiques sont inspirés de fibres amyloïdes trouvées chez des algues, des mollusques ou dans le système curli des bactéries *E.Coli*¹³¹. Une autre illustration est l'utilisation de fibres amyloïdes pour la distribution contrôlée de médicaments ou la transfection de molécules actives et nanoparticules. Cette technologie est inspirée de fibres impliquées dans le stockage et le relargage d'hormones ou rencontrées chez des virus respectivement¹³². Parmi leurs premières exploitations figurent de nouvelles générations de nano-composites. Ici, elles permettent d'améliorer des propriétés, notamment mécaniques, d'un matériau d'intérêt, ou encore d'être utilisées comme support/échafaudage pour d'autres matériaux ne pouvant pas s'organiser et former des structures stables à l'échelle nanométrique. Elles ont notamment permis

l'élaboration de nano-fils et nanotubes métalliques conducteurs. Aujourd'hui, d'intenses efforts sont déployés dans le but de maîtriser les mécanismes d'auto-assemblage des fibres amyloïdes et de les mettre à profit pour l'élaboration d'architectures 1D, 2D ou 3D pouvant aller jusqu'à l'échelle macroscopique tout en contrôlant précisément leur organisation nanométrique^{110,133}. Ces nouveaux matériaux pourront bien sûr être fonctionnalisés en fonction de l'application ciblée : culture cellulaire, ingénierie de tissus, bio-senseurs, dispositifs pour la photonique, le photovoltaïque ou encore l'électronique...

III.2.2. Focus sur l'utilisation des fibres amyloïdes pour la bioélectronique

L'utilisation des fibres amyloïdes pour l'élaboration de matériaux, et surtout de nanomatériaux, conducteurs a été principalement motivée par leur grand facteur de forme et la possibilité de modifier précisément la surface de ses objets quasi-1D mésoscopiques.

En effet, la conduction électronique intrinsèques des fibres amyloïdes est très peu étudiée puisqu'elles sont considérées, comme la plupart des matériaux biologiques^{92,93}, être des matériaux isolants. Seules quelques structures fibrillaires de type amyloïde formées par de petits peptides de synthèse (< 10 résidus) ont montré des propriétés semi-conductrices plus intéressantes^{94,97,134} (cf. introduction, **II.3.3**). Du fait de ces considérations et a priori, elles ont été rapidement utilisées en tant que matrices pour des molécules conductrices : des métaux, des semi-conducteurs organiques ou encore des enzymes catalysant un transfert électronique.

Concernant la réalisation de matériaux conducteurs, plusieurs stratégies ont été employées. La première consiste à lier des nanoparticules métalliques à des résidus ou groupes spécifiques ou à des sites de reconnaissance moléculaire. Elle permet de contrôler le site de liaison des nanoparticules et donc de leur donner une organisation précise sur tout type d'architectures amyloïde¹³⁵ (nano-fils/nanotubes 1D, film 2D ou structures plus complexes). La cystéine, capable d'établir des liaisons covalentes avec des métaux grâce à son groupe sulfhydryle, est souvent utilisée à cette fin^{92,136,137}. De cette manière, Scheibel *et al.* ont synthétisé des nanofils conducteurs, de diamètres compris entre 80 et 200nm, ayant les mêmes propriétés électriques qu'un fil métallique avec une résistance $R < 100\Omega$ et un comportement ohmique. Dans ce cas-là, des nanoparticules d'or sont liées à des résidus cystéines introduits dans la séquence d'un peptide issu du domaine prion de levure Sup35p, puis un dépôt d'or ou d'argent a été réalisé par réduction chimique sur les nanoparticules préexistantes⁹² (**Figure A.23 (a)**).

Pour la seconde stratégie, les structures amyloïdes servent d'échafaudage sur lesquels des particules métalliques ou semi-conductrices sont déposées. Reches and Gazit ont notamment tiré parti de la capacité des fibres amyloïdes du peptide diphénylalanine (FF) issu de la protéine A β à former des tubes pour synthétiser des nano-fils d'argent de diamètre ≈ 20 nm¹³⁸. Ceux-ci ont été obtenus en mélangeant ces nanotubes amyloïdes à un sel d'argent, suivi de la réduction de ce sel en argent. Enfin, la structure amyloïde est digérée par la protéinase K

(Figure A.23 (b)). Cette technique peut être utilisée avec diverses fibres amyloïdes capables de former des superstructures présentant des cavités¹³⁹.

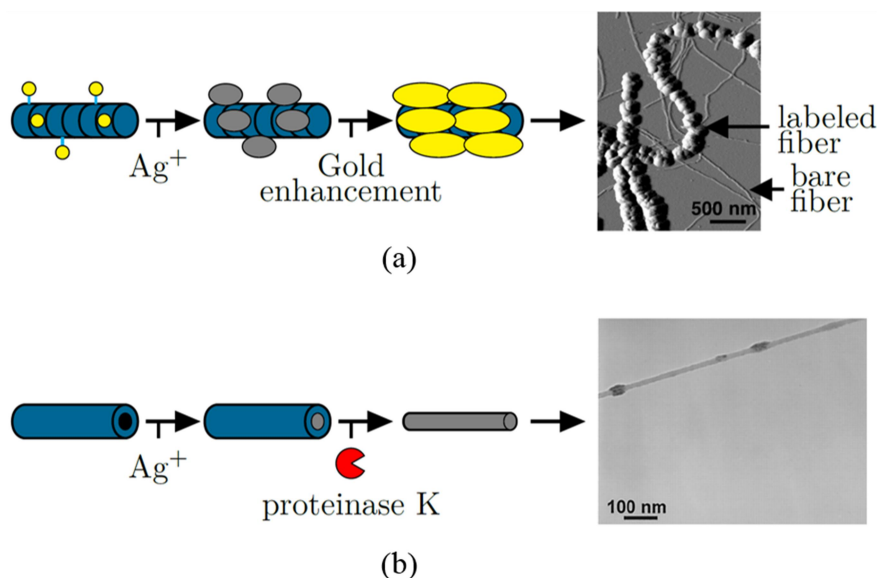


Figure A.23 : (a) Image TEM et schéma de la formation d'un nano-fil d'or obtenu en liant des nanoparticules d'or (points jaunes) à des résidus cystéines accessibles à la surface d'une fibre amyloïde puis le recouvrement métallique est étendu à toute la surface de la fibre par dépôt d'argent ou d'or sur ces nanoparticules. (b) Image TEM et schéma de la formation d'un nano-fil d'argent obtenus en réalisant un dépôt chimique d'argent dans un nanotube formé par des fibres amyloïdes de diphenylalanine. La structure protéique est ensuite digérée par des protéinases K.

Adapté de Scheibel T. *et al.*⁹² (a) et de Reches M. & Gazit E.¹³⁸ (b)

Enfin, en combinant ces deux méthodes, on peut former des nano-câbles coaxiaux, des nanotubes de fibres amyloïdes jouant le rôle d'isolant entre deux couches métalliques¹⁴⁰. Larsen *et al.* ont aussi utilisé des nanotubes de diphenylalanine comme masque de gravure pour la production de nanofils de silicium de manière simple, rapide et peu coûteuse¹⁴¹.

Il est également possible d'associer des monomères amyloïdes avec des nanoparticules métalliques antérieurement à la fribillation qui pourront ensuite s'auto-assembler spontanément pour former des structures ordonnées^{142,143} (Figure A.24 (a)&(b)). Cette méthode fonctionne avec d'autres types de molécules. Dans cet esprit, Altamura *et al.* ont construit une protéine chimère par fusion génétique entre la protéine amyloïde HET-s(218-289) et une rubrédoxine (Rd), protéine dont le site actif présente un atome de fer et catalyse les réactions d'oxydo-réduction du couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$. Cette protéine de fusion est toujours capable de former des fibres et ces dernières présentent à leur surface des protéines Rd fonctionnelles (Figure A.24 (c)&(d)). Ces nano-fils sont loin de posséder des caractéristiques conductrices métalliques mais il a été montré que des électrons pouvaient être transférés, via les centres redox des Rd, entre une électrode et une laccase, protéine réalisant la réduction de l'oxygène¹²². Ces fibres pourraient ainsi être utilisées comme médiateurs électroniques pour des biocapteurs ou des bio-piles.

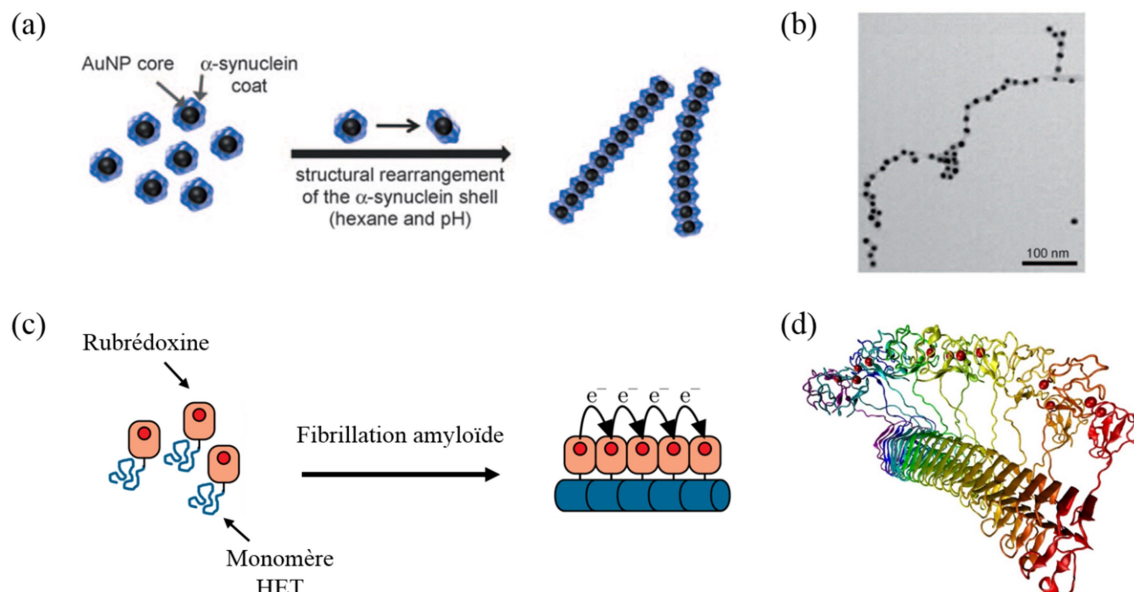


Figure A.24 : Exemple d'associations entre des monomères de protéine amyloïde et des molécules conductrices : (a) des nanoparticules d'or sont enrobées de protéines amyloïdes α -synucléines, (c) la protéine amyloïde HET est génétiquement fusionnée à une rubredoxine, protéine redox contenant un atome de fer (ronds rouges) capable de transférer des électrons. Des nano-fils conducteurs sont formés par auto-assemblage des monomères ainsi modifiés en fibres amyloïdes. (b) Image TEM d'une chaîne de nanoparticules d'or obtenue avec la technique (a). (d) Modèle de la structure d'une fibre amyloïde de 12 sous-unités HET décorée de centre redox synthétisée avec la méthode (c).

Adapté de Lee D. *et al*¹⁴² (a) et (b) et de Altamura L.¹⁴⁴ (c) et (d)

Enfin, ces structures amyloïdes peuvent servir d'échafaudage pour la polymérisation dirigée de polymères conducteurs électroniques intrinsèques. La polymérisation s'effectue alors directement à la surface des structures amyloïdes sur laquelle des monomères ad hoc sont adsorbés. Hamedi *et al.* ont été les premiers à utiliser cette stratégie pour la polymérisation du poly(3,4-éthylènedioxythiophène), le PEDOT, sur des fibres d'insuline.

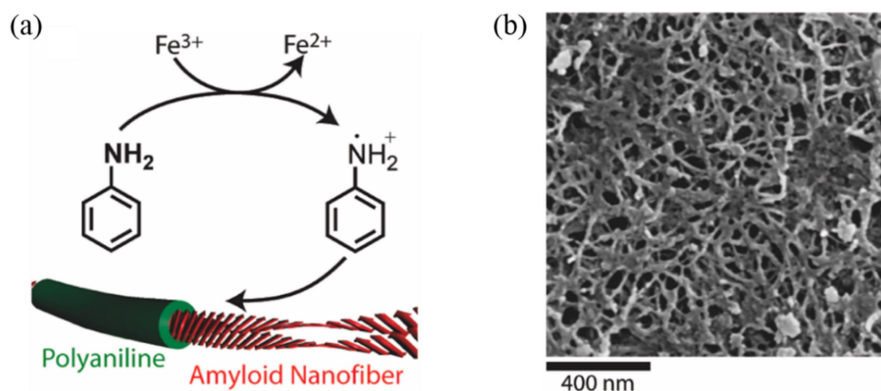


Figure A.25 : Polymérisation de l'aniline sur des fibres amyloïdes de lysosyme. (a) Schéma du mécanisme proposé de la réaction de polymérisation. (b) Image de microscopie électronique à balayage (SEM) d'un film de fibres amyloïdes/polyaniline.

Tiré de Meier C. *et al*¹⁴⁵

Le polymère ainsi formé conserve de bonnes propriétés électriques avec une conductivité électronique d'environ 1 S.cm^{-1} ¹⁴⁶. Plus récemment, Meier *et al.* ont polymérisé de la même façon de l'aniline sur des fibres de lysozyme (**Figure A.25**) conduisant à la formation d'un polymère conducteur, la poly(aniline), avec un comportement ohmic entre 0 et 1V et une conductivité de l'ordre de 0.1 S.cm^{-1} ¹⁴⁵.

III.3. La Protéine amyloïde HET-s(218-289)

Les travaux présentés dans ce manuscrit se focalisent sur les propriétés de transport dans les fibres amyloïdes formées par le domaine prion de la protéine HET-s. Cette protéine fonctionnelle et non toxique contrôle le processus de reconnaissance du soi et du non-soi lors de la reproduction du champignon filamentueux *Podospora anserina*¹⁴⁷. Sa chaîne polypeptidique comporte 289 acides aminés et possède deux domaines indépendants d'un point de vue structurel et fonctionnel. Le domaine N-terminal de structure globulaire, est impliqué dans le processus de reconnaissance tandis les résidus 218 à 289 du côté C-terminal, soit HET-s(218-289), forment le domaine prion. Ce dernier s'auto-assemble en fibre amyloïde, agissant comme matrice de support au premier domaine. HET-s(218-289) étant nécessaire et suffisant pour la formation des fibres, il est possible d'isoler ces deux domaines et éventuellement de remplacer le domaine globulaire par une autre protéine fonctionnelle, sans dénaturer la structure fibrillaire. De plus, il est possible de produire des échantillons hautement homogènes, sans polymorphisme. En particulier, les fibres monobrins (une seule protofibre) sont stables, ce qui est plutôt rare pour les fibres amyloïdes. Ainsi, des travaux menés antérieurement dans l'équipe (en particulier les travaux de thèse des Dr. Christophe Horvath et Dr. Lucie Altamura) ont conduit à la création de la protéine chimère Rd-HET formant des fibres amyloïdes décorées de centres redox (rubrédoxine : Rd) pour le transfert de charges^{122,144}.

III.3.1. Présentation générale

Les aspects (cités plus haut) de non pathogénicité, de structure hautement ordonnée et de production homogène d'échantillons font de HET-s une protéine énormément étudiée. La structure et les mécanismes de formation des fibres amyloïdes HET-s(218-289) sont connus et décrits dans la littérature. Les fibres HET-s(218-289) sont d'ailleurs les seules fibres amyloïdes dont on ait un modèle de structure de haute résolution complet. Il a été établi par Wasmer *et al.* par SS-RMN en 2008¹¹⁹. Ces fibres ont la forme d'un solénoïde composé de quatre feuillets- β avec une hélicité gauche. Les trois premiers feuillets délimitent un cœur hydrophobe rigide alors que le quatrième ressort à l'extérieur pour dessiner une poche semi-hydrophobe avec le reste de la structure (**Figure A.26**). Chaque monomère compose deux strates de brins- β stabilisées par des liaisons-H et des ponts salins. L'empilement des monomères est aussi stabilisé par liaisons-H. Ces dernières sont toutes orientées parallèlement à l'axe de la fibre et deux monomères successifs sont espacés de 0.94 nm.

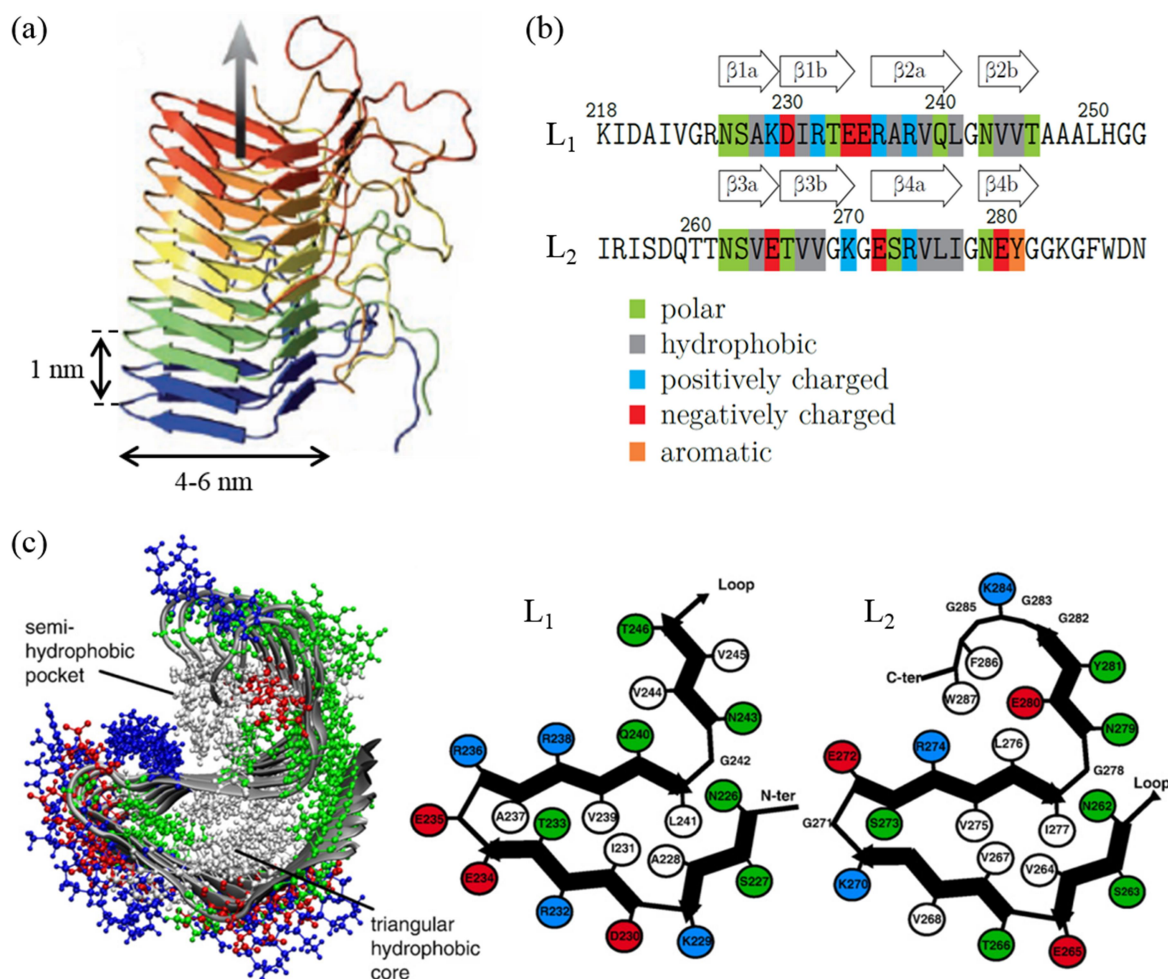


Figure A.26 : (a) Structure d'une fibre amyloïde HET-s(218-289) composée de 5 sous-unités, chacune représentée de couleur différente, calculée à partir des données de RMN du solide haute résolution (SS-NMR). Code PDB : 2RNM. Les brins- β formant le cœur de structure de la fibre sont indiqués par des flèches. (b) Séquence en acides aminés de la protéine HET-s(218-289). Chaque monomère de protéine se replie en formant deux couches de brins- β au sein de la fibre amyloïde (L_1 et L_2). Les acides aminés impliqués dans la formation des brins- β sont mis en évidence par des flèches et colorés suivant leur nature chimique. (c) Représentation schématisques des deux couches d'un monomère de la protéine au sein d'une fibre et structure de la fibre sous le même angle de vue et avec le même code couleur suivant la nature des résidus : hydrophobe en blanc, polaire en vert, chargé positivement en bleu et chargé négativement en rouge. Les brins- β sont représentés par des flèches noires épaisses.

Adapté de Wasmer C. *et al*¹¹⁹ (a), Altamura L.¹⁴⁴ (b) et Van Melckebeke H. *et al*¹⁴⁸ (c)

D'un point de vue morphologique, les fibres amyloïdes HET-s(218-289) peuvent être formées *in-vitro* sous la forme élémentaire d'une seule fibre ou, suivant les conditions physico-chimiques citées plus haut, associées latéralement en nombre variable. Le diamètre d'une fibre élémentaire a été mesuré entre 4 et 6 nm par TEM avec une coloration négative¹⁴⁹ (**Figure A.27 (a)**). Ces mono-fibres HET-s(218-289) sont très longues, leur longueur excédant souvent 10 μm . Ce fort ratio (typiquement > 2000) longueur/diamètre empêche une

bonne appréciation de leur longueur par les techniques de microscopie classique mais est un atout pour les applications bioélectroniques. Enfin, le pas d'hélice des fibres a été estimé autour de 40 nm par cryo-TEM¹⁵⁰ et AFM¹⁴⁴.

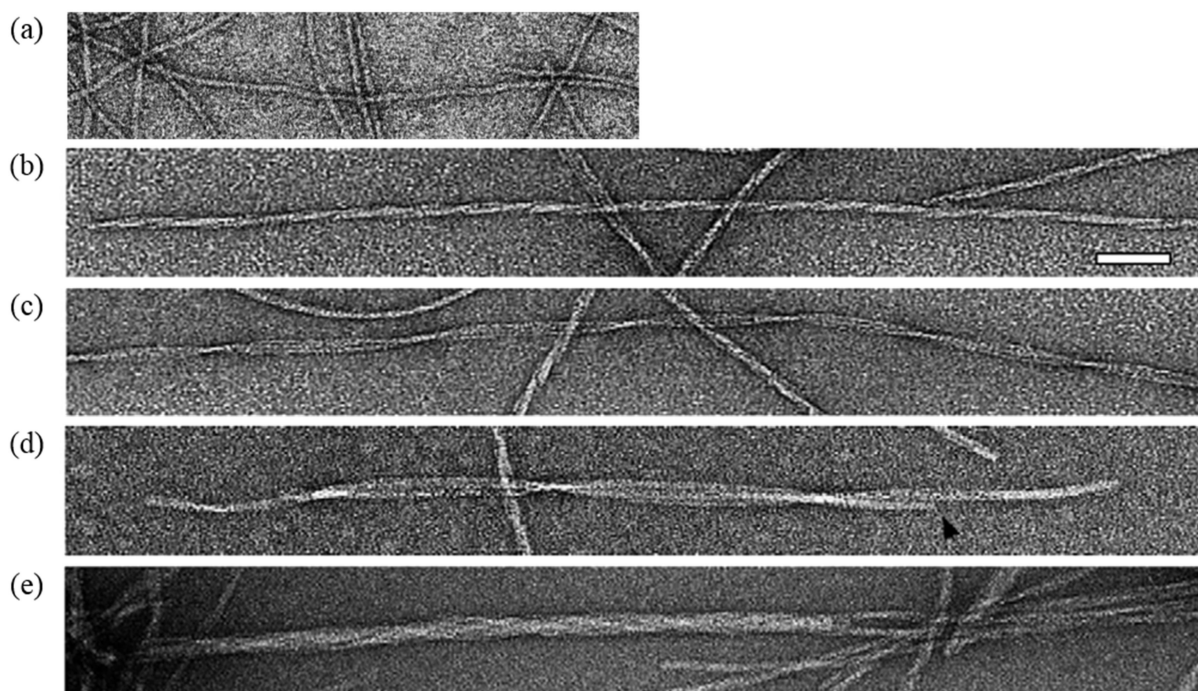


Figure A.27 : Images TEM avec coloration négative de fibres amyloïdes HET-s(218-289) présentant des morphologies différentes, échelle = 50 nm : (a) dispersion de fibres unitaires isolées, diamètre de *ca.* 6 nm (pH4), (b) association de 3 mono-fibres en triple-fibres torsadées, diamètre $\approx$ 9-10 nm, (c) association de 3 mono-fibres en ruban, largeur maximale de *ca.* 14 nm, (d) association de 6 mono-fibres en ruban, largeur maximale de *ca.* 18 nm et (e) faisceau compact de fibres plus important, diamètre de *ca.* 17-22 nm. Les fibres montrées en (b)(c)(d)(e) sont obtenues à pH2.

Tiré de Altamura L.¹⁴⁴ (a) et de Sabaté R. *et al*¹⁴⁹ (b)(c)(d)(e)

Le pH et la force ionique sont les principaux paramètres influençant le polymorphisme des fibres (**Figure A.27**). Entre pH 3 et 4 et faible force ionique (< 1 mM), une dispersion homogène de mono-fibres est obtenue^{144,150}. A pH inférieur, les fibres isolées s'associent majoritairement en triple-fibres torsadées mais peuvent aussi former de plus grosses structures du type des assemblages plus importants formés pH 7^{149,150} : des câbles de diamètre très variable jusqu'à plus de 200 nm sont alors observés.

III.3.3. Structure de HET-s(218-289) au regard du transport de charges

La structure hautement organisée des fibres amyloïdes faite de la répétition d'un même motif sur des dizaines voire centaines de sous-unités induit mécaniquement un agencement périodique des acides aminés selon l'axe de la fibre, dont certains possèdent des chaînes latérales avec des fonctions chimiques pouvant être impliquées dans des mécanismes de transfert de charges. C'est notamment le cas des groupes chargés qui peuvent être ionisés et

aussi établir des interactions électrostatiques, tout comme les résidus polaires, avec entre autres des molécules d'eau. En observant la séquence peptidique de HET-s(218-289), on remarque que les résidus hydrophobes sont plutôt concentrés dans le cœur triangulaire. Les acides aminés polaires et chargés se situent plutôt quant à eux en surface où l'accessibilité au solvant est meilleure (**Figure A.26 (b)&(c)**). Les résidus R238–R274 forment ainsi une chaîne de résidus chargés positivement et les résidus K229–E265, E234–K270 et R236–E272 des chaînes de résidus présentant des charges alternativement positives et négatives.

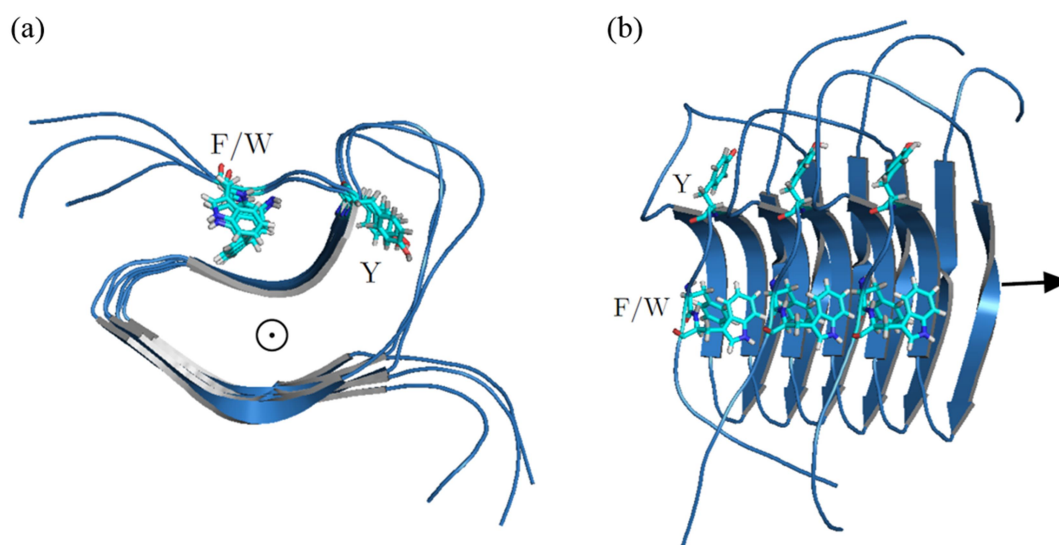


Figure A.28 : Structure d'une fibres amyloïde HET-s(218-289) constituée de 3 sous-unités (code PDB 2KJ3) vue du dessus (a) et vue latérale (b). Les trois résidus aromatiques, tyrosine (Y), phénylalanine (F) et tryptophane (W), sont mis en évidence.

Tiré de Altamura L.¹⁴⁴

L'interaction entre la surface extérieure de la fibre et l'eau est du reste importante. Cela a été démontré par une expérience d'échange isotopique hydrogène/deutérium dans une solution contenant des faisceaux de fibres qui a mis en évidence la présence d'eau tout autour de chaque fibre individuelle et l'absence de surface de contact sèche étendue entre les fibres d'un même faisceau¹⁴⁸. Il est possible qu'une fraction de ces molécules d'eau environnant les fibres soit structurales et résiste au séchage, même poussé. L'eau peut favoriser des transferts d'électrons, notamment inter-fibres, et/ou participer au transport de protons.

On notera également la présence de trois résidus aromatiques, une tyrosine (Y281) située sur le dernier brin- β de la deuxième strate de monomère et orientée à l'extérieur de la poche semi-hydrophobe ; et une phénylalanine et un tryptophane (F286 et W287) situés sur le segment flexible N-terminal refermant la poche semi-hydrophobe (**Figures A.28 et A.26 (c)**). Ces deux derniers résidus sont essentiels au processus d'auto-assemblage de la protéine en fibre même s'ils ne font pas parti du cœur rigide de la fibre¹⁵¹. Dans la plupart des fibres amyloïdes, les noyaux aromatiques participent à la stabilité de la structure en générant des empilements π par interactions non-covalentes de type van der Waals (π - π stacking⁶⁸). On peut supposer que ce type d'interaction, favorisant les processus de transport électronique (cf. Introduction **II.2.2**), est également possible pour F286 et W287.

Matériels et méthodes

I- Production des échantillons de protéine

I.1. Production de la protéine recombinante HET-s(218-289)

La production de protéines recombinantes est une pratique très courante des laboratoires de biochimie. Il s'agit de protéines produites par un organisme sélectionné (bactéries, cellules de mammifères, animaux transgéniques etc...) dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison(s) génétique(s). Dans notre cas, le gène codant pour la séquence peptidique de HET-s(218-289) a été isolé du génome du champignon *Podospora Anserina* et inséré dans le plasmide pET-24a(+). Ce dernier est ensuite introduit dans des bactéries *E.Coli* qui se chargeront de répliquer et de sur-exprimer notre gène d'intérêt, c'est-à-dire produire la protéine HET-s(218-289) en grande quantité. Ce plasmide est une molécule d'ADN circulaire construite par génie génétique comportant un ensemble de gènes permettant sa réplication et son expression ainsi que des gènes de résistance aux antibiotiques kanamycine et chloramphénicol qui permettront de sélectionner les bactéries ayant bien reçu le plasmide. Une étiquette poly-histidine (His₆) a également été ajoutée à l'extrémité N-terminale du gène de HET-s(218-289) pour permettre la purification de la protéine par une méthode d'affinité ionique. Par la suite, on nommera HET la protéine produite HET-s(218-289)-His₆. Ses paramètres caractéristiques théoriques sont présentés dans le **tableau B.1** (calculés avec ExPASy).

	Nb acides aminés	Mw (kDa)	pI _{th}	ε ₂₈₀ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
HET	79	8.65	8.26	6990

Tableau B.1

I.1.1. Expression et purification de HET

Le protocole d'expression et de purification de HET a été établi par les Dr. Christophe Horvath et Dr. Lucie Altamura sur inspiration de Balguerie *et al*¹⁵². Il est présenté en détail en **Annexe** et recourt à des techniques de biochimie moléculaire classiques. La protéine HET a la particularité de former des corps d'inclusion non solubles dans les bactéries. Ces corps d'inclusion consistent en de petits agrégats de type amyloïde aussi résistants aux protéases que les fibres amyloïdes matures¹⁵³. Il n'est donc pas nécessaire d'utiliser des inhibiteurs à protéase lors ce processus de production.

I.1.1. i) Transformation et culture bactérienne

L'organisme hôte choisi pour la réplication du plasmide et l'expression de notre gène d'intérêt est une souche de bactéries compétentes *E.Coli*, BL21-CodonPlus(DE3)-RIL particulièrement bien optimisée pour la production de la protéine HET. La transformation génétique de ces bactéries, *i.e.* l'insertion du plasmide d'intérêt dans les bactéries, est réalisée par choc thermique. Ces bactéries sont ensuite mises en culture en milieu LB (bouillon lysogène) dans lequel de la kanamycine et du chloramphénicol ont été ajoutés. Les bactéries ayant bien reçu le plasmide comportant des gènes de résistance à ces antibiotiques sont ainsi les seules à pouvoir survivre et se développer. Des cultures de plus en plus importantes, jusqu'à 1L, sont effectuées en milieu LB liquide, toujours additionné d'antibiotiques. Durant cette étape, le plasmide est fortement répliqué par multiplication des bactéries. L'accroissement de la population bactérienne est surveillé par des mesures régulières de la densité optique à 600nm (DO_{600}) du milieu de culture. Dès que cette DO atteint environ 0.7, la production de la protéine est induite par ajout de 1mM d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), molécule interagissant avec les gènes promoteurs de la transcription du gène d'intérêt et provoquant l'activation des mécanismes de transcription génétique (**Figure B.1 (a)**). La culture bactérienne est ensuite poursuivie jusqu'à atteindre une DO_{600} comprise entre 2 et 2.5. Les bactéries sont enfin collectées par centrifugation. Le culot obtenu peut-être stocké à -80°C ou bien on peut immédiatement procéder à l'extraction et purification de la protéine.

I.1.1. ii) Extraction et purification

Comme vu précédemment, la protéine HET produite dans les bactéries se retrouve sous la forme de corps d'inclusions non solubles. Cela permet d'ajouter une étape de lavage éliminant la plupart des contaminants solubles (**Figure B.1 (b)**) avant la purification de la protéine par chromatographie d'affinité. Ainsi, après la première étape de sonication et centrifugation, les corps d'inclusions se retrouvent dans le culot avec les débris membranaires et d'autres protéines et composés insolubles. Ce culot est lavé trois fois par re-suspension du culot dans un tampon à pH8 suivi d'une centrifugation. Le deuxième lavage contient 2% de Triton X-100 pour solubiliser les membranes et les protéines membranaires. Les corps d'inclusion restent insolubles tout au long du lavage et doivent être par la suite solubilisés pour permettre leur passage sur colonne de purification. Ceci est possible en utilisant des conditions dénaturantes pour les protéines. L'urée, habituellement utilisée pour dénaturer les protéines, n'est pas suffisante pour solubiliser les corps d'inclusion, c'est pourquoi de la guanidine hydrochloride (GuHCl) est préférée¹⁴⁹. La purification est ensuite réalisée grâce à une colonne de chromatographie constituée d'une résine contenant des ions nickel (Ni) (colonne HisTrap FF Ni Sepharose, GE Healthcare) permettant de retenir la protéine d'intérêt grâce à l'interaction entre les ions Ni et son étiquette His₆. Après élimination par lavage des impuretés non retenues à la colonne, l'élution avec une solution tampon de Tris 50 mM, urée 8 M et imidazole (IMDZ) 300mM à pH8 permet de collecter la protéine HET-s(218-289) avec un haut degré de pureté (**Figure B.1 (c)**). Enfin, un échange de tampon sera nécessaire afin de se placer dans des conditions re-naturantes pour la protéine.

L'efficacité de des étapes de purification est vérifiée par électrophorèse en gel SDS-PAGE 15% de différents prélèvements (**Figure B.1**). La concentration des échantillons purifiés est estimée par spectroscopie d'absorption UV-visible à 280 nm. Ce protocole permet l'obtention d'échantillons de protéine HET très purs avec un rendement entre 20 et 25 mg par litre de culture.

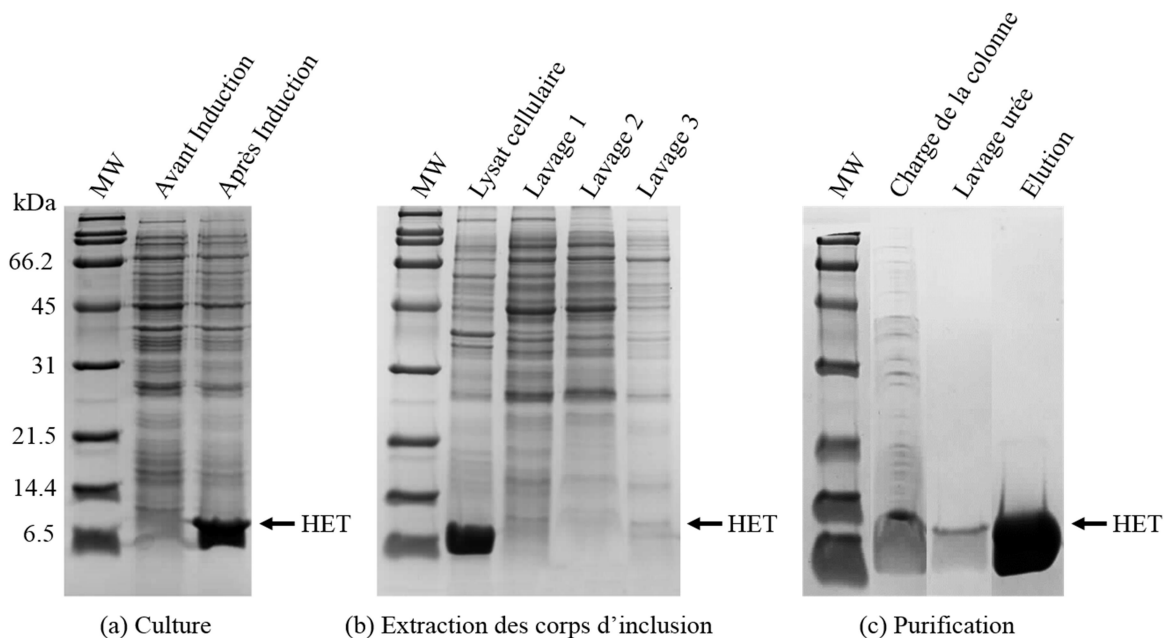


Figure B.1 : Résultat d'électrophorèse en gel SDS-PAGE 15% des étapes d'expression et purification de la protéine HET. Pour les gels (b) et (c) montrant les étapes de purification, la quantité d'échantillon déposé est identique. Coloration au bleu de Coomassie. Le marqueur de masse moléculaire (Mw) est le même pour tous les gels (SDS-PAGE Standards Broad Range, Bio-Rad). La bande correspondant à HET, indiquée par une flèche, se situe autour de 9 kDa. (a) Culture : la bande très intense correspondant à HET témoigne de la surexpression de la protéine par les bactéries après induction. (b) Extraction des corps d'inclusion : composition du lysat cellulaire où HET est présente et des surnageants correspondant aux trois lavages successifs. Aucune perte de HET n'est à déplorer lors de cette étape. (c) Purification par chromatographie d'affinité ionique : charge de la colonne avec les corps d'inclusion solubilisés, lavage avec le tampon urée 8M et élution. Un peu de HET ne s'accroche pas à la colonne et est perdue lors du lavage mais on récupère à la fin de la purification une protéine très pure et quantité suffisante.

1.1.2. Dialyse, organisation supramoléculaire de la protéine

Pour finir, les échantillons purifiés sont soumis à un échange de tampon par dialyse grâce à une membrane (membrane de dialyse Spectra/Por 7 RC, Spectrum Laboratories) avec une limite de séparation de masse moléculaire (Mw) de 1 kDa, imperméable à HET. Le tampon de dialyse est choisi de manière à retrouver des conditions naturantes pour les protéines et à autoriser ou non l'agrégation de HET en fibres. Les conditions permettant d'obtenir et de conserver des échantillons bien homogènes (pas de polymorphisme) ont été établies par le Dr. Lucie Altamura (**Figure B.2 (a)**):

- Protéine sous forme de monomère : solution d'acide acétique (AcAc) à 180 mM, pH acide (<3) et concentration en protéine indifférente.
- Formation de fibres monobrins isolées : solution HCl à 0.1 mM, pH4 et forte concentration en protéine (>100 μ M)

L'état morphologique des échantillons est systématiquement vérifié par dichroïsme circulaire (CD) dans l'UV lointain. Cette technique de spectroscopie optique permet l'étude de la structure secondaire des protéines. Elle permet notamment la détection et une estimation de la quantité d'hélices- α , feuillets- β , tour et structures désordonnées dans un échantillon de protéines. Par conséquent, les échantillons de HET sous forme de fibres auront un spectre très proche d'un spectre obtenu avec des protéines sous forme de feuillets- β avec la présence d'un pic négatif autour de 218-220 nm, alors que les échantillons de monomères désorganisés auront un spectre typique des structures désordonnées présentant un pic négatif légèrement en dessous de 200 nm (**Figure B.2 (b)**).

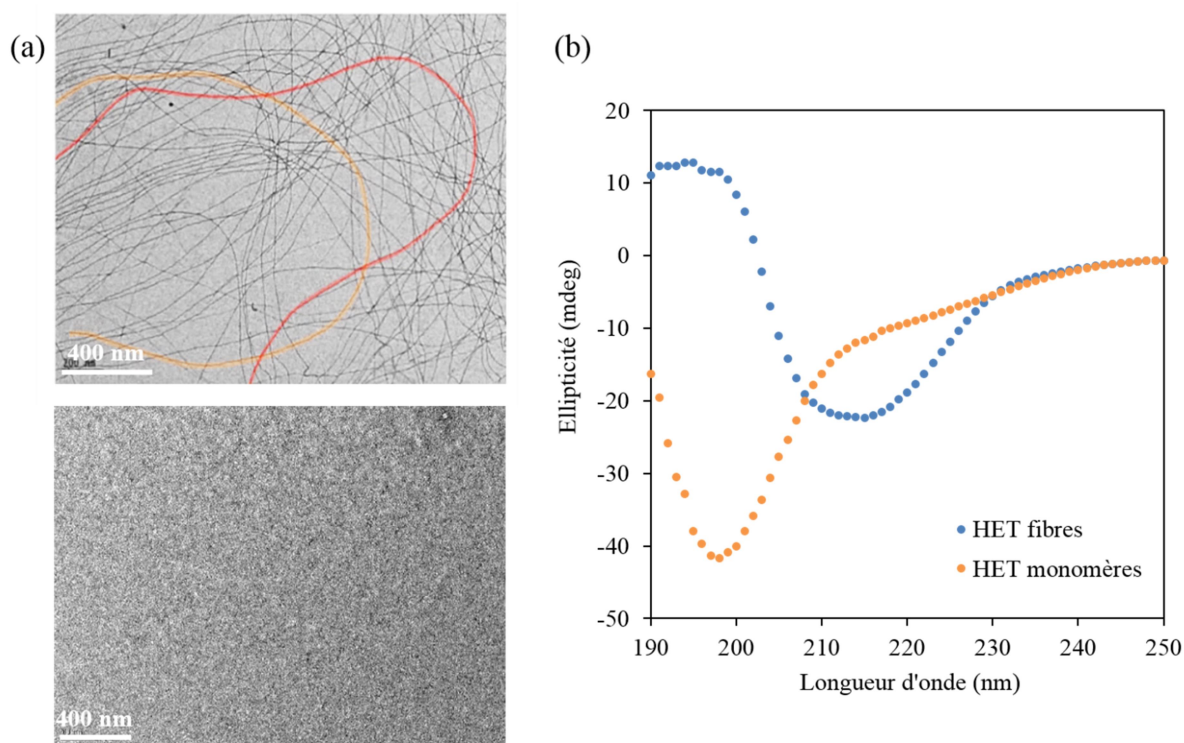


Figure B.2 : Différentes morphologies des échantillons de protéine HET. (a) Images de TEM par coloration négative d'un échantillon homogène de HET sous forme de fibre amyloïde monobrins isolés (haut) et d'un échantillon homogène de HET monomérique (bas) Pour l'exemple, deux fibres différentes ont été surlignées en rouge et orange ce qui met en évidence le facteur de forme extrêmement élevé des fibres HET. Les oligomères ne sont pas visualisés par TEM. (b) Spectres CD UV lointain correspondant à ces deux types d'organisation de la protéine.

Par la suite, sauf indication contraire, la dénomination "fibres HET" sera utilisée pour parler des échantillons homogènes préparés dans l'HCl 0.1 mM, pH4 et constitués de mono-fibres HET isolées les-unes des autres. On parlera également de "monomères HET" pour les échantillons homogènes de protéine HET non organisée et préparés dans l'AcAc 180 mM.

II- Etude du transport de charges dans les fibres amyloïdes HET

La très grande majorité des études cherchant à évaluer les propriétés de conduction des matériaux biologiques (ADN, protéines, bio-polymères...) sont menées grâce à des dispositifs de mesure à 2 électrodes ou plus récemment avec des dispositifs à effet de champ. C'est pourquoi, dans notre cas, la caractérisation électrique des fibres amyloïdes HET a été menée en grande partie avec un dispositif à 2 électrodes, le plus simple à mettre en œuvre. Des tests ont quand même été réalisés avec des dispositifs spécialement conçus pour des mesures à effet de champ et pour la caractérisation de matériaux biologiques par une équipe du Laboratoire d'électronique et de technologie de l'information (LETI) de Grenoble¹⁵⁴. Cependant, ces essais n'ont pas été concluants (la cause reste à définir : problème dans la conception ou lors de la production des dispositifs ?, interaction inattendue de la protéine avec les matériaux utilisés ? ...) et ne sont pas présentés dans ce manuscrit.

II.1. Caractérisation électrique

II.1.1. Méthode de mesure deux pointes

Les expériences de caractérisation électrique ont été réalisées grâce à un dispositif à deux électrodes constitué de quatre électrodes de carbone vitreux (GC) (Bio-Logic) de 6 mm de diamètre encastrées dans un support en Téflon, matériau isolant et hydrophobe (**Figure B.3 (a)**). Le gap entre les électrodes est de 1 mm. Ce système permet donc l'étude de deux échantillons simultanément.

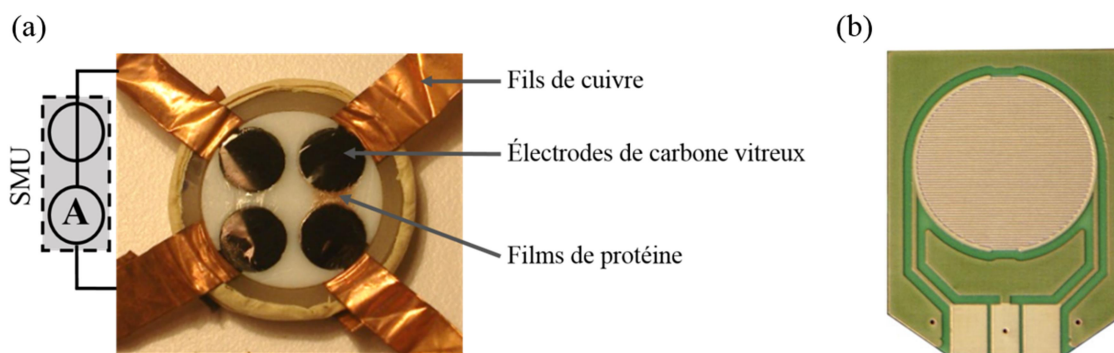


Figure B.3 : Dispositif pour la caractérisation. (a) dispositif à 2 électrodes utilisé pour les mesures de conduction électrique. (b) électrodes interdigitées en or et de gap 150 μm pour la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS). Le peigne a une structure ronde de diamètre 15 mm.

Les électrodes de GC sont reliées à des fils de cuivre pour faciliter leur connexion à l'appareil de mesure (système de caractérisation des semi-conducteurs Keithley 4200 à quatre unités de source et de mesure (SMU), Tektronix Company). Avant tout dépôt d'échantillon, les électrodes sont polies à la main avec des pâtes d'alumine (Al_2O_3 , 1,0 et 0,3 μm , Buehler) sur des morceaux de feutre, puis rincé à l'eau distillée.

Les échantillons de protéine sont caractérisés sous la forme de films "secs" constitués de protéine concentrée entre 300 et 600 μM quelle que soit la forme de la protéine, fibrillaire ou monomère. Ces films sont obtenus par dépôt et séchage d'une goutte de 40 μL d'échantillon entre les électrodes. Les gouttes de protéine sous forme de fibre sont laissées sécher par évaporation à atmosphère ambiante tandis que les échantillons de monomères sont séchés rapidement (au sèche-cheveux) afin d'éviter la formation de fibres qui peut avoir lieu lors de cette phase (effet de concentration) (**Figure B.4 (c)**). Pour vérifier l'aspect de ces films, des dépôts ont été réalisés à l'identique sur des lames de verre afin de pouvoir être observés par AFM en mode "contact intermittent" (PFT, pour PeakForce Tapping en anglais) (**Figure B.4**).

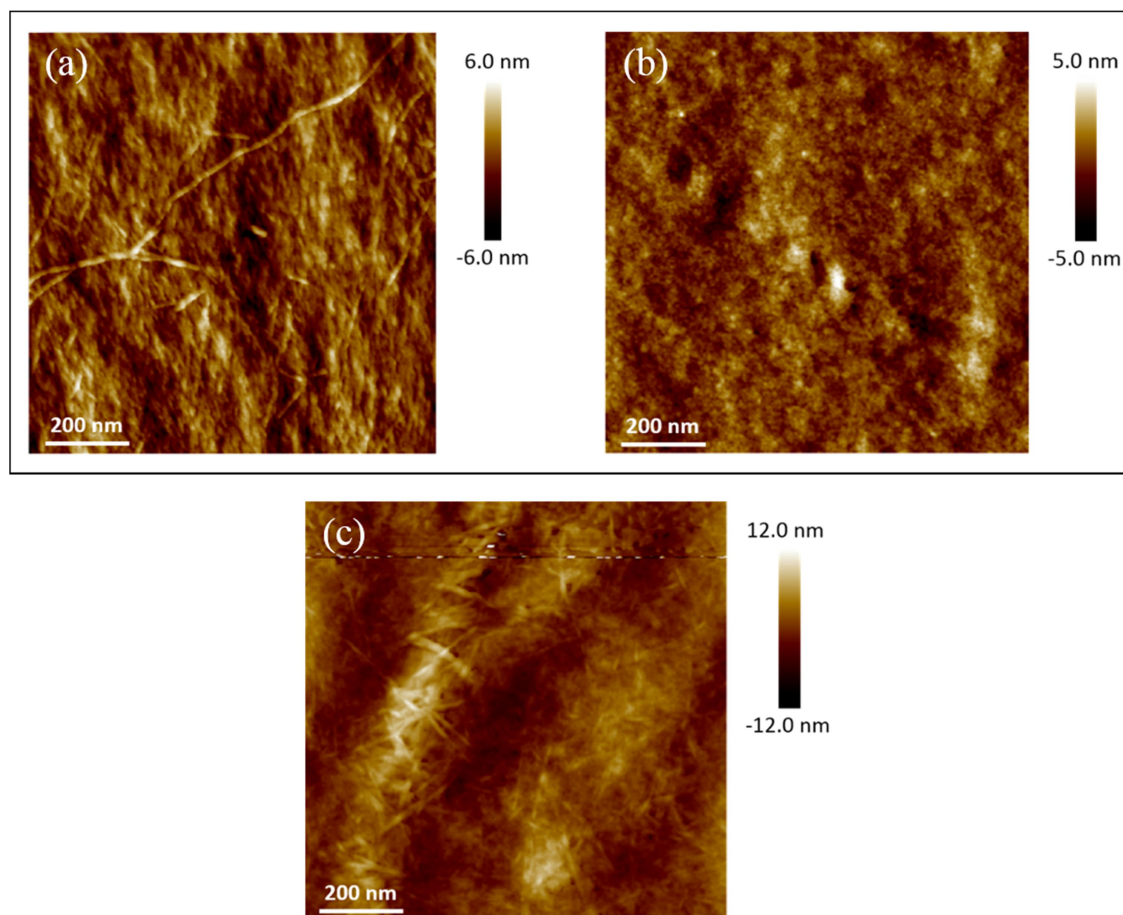


Figure B.4 : Images AFM-PFT de films "secs" de protéine HET hautement concentrée (entre 300 et 600 μM) sous différentes morphologies. En encadré, aspect des films typiquement caractérisés avec HET sous forme de fibres amyloïdes dans HCl 0.1 mM (a) et de monomères dans AcAc 180 mM (b). (c) Goutte d'échantillon de HET monomérique laissé sécher lentement par évaporation, des fibres commencent à se former. Images réalisées avec : AFM Dimension1 (Bruker) placé en boîte à gant, atmosphère air ; pointe ScanAsyst (Bruker), $k \sim 0.2$ N/m (Thermal Tune, $T = 26$ °C). Images traitées avec NanoScope Analysis (v 1.5).

II.2. Spectrométrie d'impédance électrochimique (EIS)

Des caractérisations par EIS ont également été effectuées sur des films "secs" de protéines déposés entre des électrodes interdigitées en or de gap 150 μm (**Figure B.3 (b)**) (BDS1410-15-150 interdigit electrode, Novocontrol Technologies). Une goutte de 150 μL d'échantillon concentré entre 200 et 300 μM est déposée de manière à recouvrir toute la surface des électrodes, puis séchée. (La concentration est un peu moins élevée que dans le cas des films du système à deux électrodes par un souci d'économie d'échantillon). Ces mesures ont été effectuées avec un potentiostat Bio-Logic SP200.

La spectrométrie d'impédance électrochimique est une technique couramment utilisée pour la caractérisation des systèmes électrochimiques qui repose sur la mesure d'une fonction de transfert suite à la perturbation volontaire du système étudié. Cette perturbation est le plus souvent un signal électrique sinusoïdal imposé par un potentiostat autour d'un point de fonctionnement stationnaire ou quasi-stationnaire du système d'étude. Le signal doit rester de faible amplitude afin de rester dans le domaine linéaire du système. Dans notre cas, le système électrochimique consiste en la combinaison d'un électrolyte solide (film de protéines) et des interfaces électrodes/électrolyte. Ainsi, la mesure de l'impédance du système pour plusieurs fréquences d'excitation permet de discriminer les contributions des différents éléments électro-actifs présents au sein du système, chacun ayant des cinétiques distinctes.

Concrètement, un signal sinusoïdal E est imposé avec un balayage en fréquence :

$$E(t) = E_0 \sin(\omega t) \quad \left| \begin{array}{l} \text{Avec } E_0 \text{ un potentiel (V) fixé dans le} \\ \text{domaine de linéarité du système, et la} \\ \text{fréquence } f \text{ (Hz) définie par } f = \omega/2\pi. \end{array} \right.$$

La réponse du système à cette perturbation est évaluée par la mesure du courant à la sortie de ce système. Ce signal sera lui aussi de forme sinusoïdale et sera accompagné d'un déphasage dépendant des éléments électriques composant le système d'étude. Il est défini par :

$$I(t) = I_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad \left| \begin{array}{l} \text{Avec } \varphi \text{ le déphasage entre les signaux} \\ \text{d'entrée et de sortie.} \end{array} \right.$$

L'impédance Z correspond alors au rapport du signal d'entrée sur le signal de sortie $\frac{E(t)}{I(t)}$ et est généralement exprimée avec la notation complexe: $Z = Z_{Re} + jZ_{Im}$

Les spectres d'EIS sont communément représentés dans des diagrammes de Nyquist où la partie imaginaire de l'impédance, mesurée pour chaque fréquence, est tracée en fonction de sa partie réelle. L'interprétation de ces spectres consiste à construire un circuit électrique modélisant le comportement du système. Les diagrammes ainsi modélisés doivent concorder le plus possible aux diagrammes expérimentaux et les composants électriques choisis pour la construction du circuit équivalent doivent être associés à des phénomènes physico-chimiques réellement présents au sein du système étudié.

III- Etude de la structure des échantillons

Les deux techniques d'imagerie à transmission électronique (TEM) et à force atomique (AFM) ont servi à l'étude de l'aspect des échantillons de protéines. Le TEM a été utilisé pour vérifier la morphologie (oligomères ou fibres), la bonne homogénéité des échantillons, et particulièrement pour s'assurer de la bonne fibrillation de la protéine HET dont des mutations ont été réalisées (cf : Résultats et discussions **III.3.1.**). L'AFM a plutôt servi à étudier l'aspect des films "secs" de protéine caractérisés électriquement.

III.1. Techniques d'imagerie TEM et AFM

III.1.1 La Microscopie Electronique en Transmission

La microscopie électronique en transmission (MET ou TEM en anglais pour "*Transmission Electron Microscopy*") est une technique de microscopie recourant à un faisceau d'électrons pour irradier un échantillon qui doit être assez fin pour être relativement transparent aux électrons (épaisseur inférieure à une centaine de nanomètres). La source, ou canon à électrons, émet un faisceau traversant la colonne du TEM dans laquelle le vide a préalablement été établi. Dans cette colonne, des lentilles électromagnétiques et électrostatiques sont commandées pour focaliser et manier le faisceau électronique. Puis, lorsque ce dernier rencontre l'échantillon, des effets d'interaction électrons-matière ont lieu. Des électrons peuvent être absorbés ou diffusés suivant la densité et la composition chimique du matériau traversé et ne feront alors pas parti du faisceau transmis. Ce dernier est détecté sur un écran phosphorescent qui transforme l'image électronique de l'échantillon en image optique. Les contrastes de l'image obtenue correspondent donc aux différentes densités, épaisseurs et compositions chimiques de l'échantillon (**Figure B.5(a)**).

Pour pouvoir être observés en transmission, outre le fait d'être suffisamment fins, une préparation spécifique des échantillons est nécessaire afin qu'ils ne soient pas dégradés trop rapidement. De plus, les matériaux organiques sont principalement constitués d'atomes légers (H, C, O) qui interagissent très peu avec les électrons, par conséquent, des techniques de préparation permettant d'augmenter le contraste sont employées. Aussi, dans le cas de nos échantillons de fibres amyloïdes, une coloration négative est réalisée. Une dispersion diluée de fibres est déposée sur une grille métallique (**Figure B.5 (c)**). L'échantillon est ensuite fixé en utilisant une solution de coloration négative contenant des atomes lourds comme de

l'uranium, de l'osmium ou encore du tungstène. Ce colorant rempli à la fois les rôles de rendre l'échantillon résistant au faisceau et d'augmenter le contraste de l'image. En effet, celui-ci se fixe préférentiellement autour des objets organiques adsorbés sur la grille. La matière organique apparaît lumineuse sur l'image alors que le colorant, beaucoup plus dense, absorbe et diffuse davantage les électrons et apparaît plus sombre. De la sorte, c'est une image négative de l'échantillon qui est observée (**Figure B.5 (b)**).

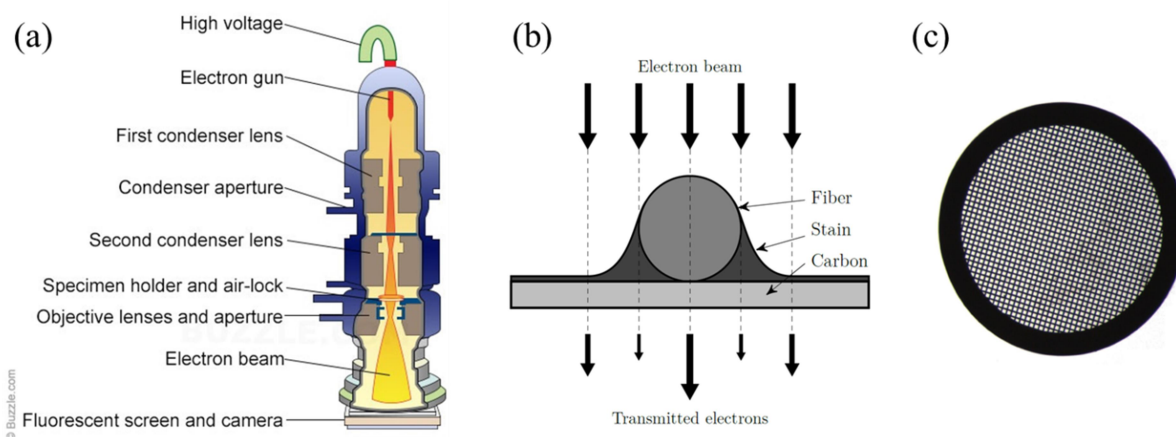


Figure B.5 : (a) Représentation schématique des principaux composants d'un microscope électronique à transmission. (b) Schéma d'une coupe transversale montrant une fibre préparée pour la microscopie TEM sur un film de carbone avec une coloration négative. (c) Cliché optique d'une grille en cuivre typiquement utilisée pour cette technique de microscopie. La grille est recouverte d'un film de carbone transparent aux électrons sur lequel l'échantillon est déposé. Les trous de la grille sont suffisamment fins pour que le film reste tendu sans se casser à travers eux.

Les images de TEM ont été réalisées par le Dr. Lucie Altamura avec un microscope Philips CM12 (résolution d'image entre 0.2 et 0.34 nm) de la plateforme Electron Microscopy de l'Institut de Biologie Structurale. Les échantillons de protéines sont dilués à *ca.* 1 mg.mL⁻¹ et une goutte déposée sur une grille de cuivre enrobée d'un film de carbone. Après environ 30 s, la goutte est retirée et les protéines adsorbées sur la grille sont colorées avec de l'acétate d'uranyle 2% : une goutte de l'agent de contraste est déposée et séchée après 30 s avec un papier-filtre. Cette méthode permet d'imager les différentes organisations des fibres HET mais pas les oligomères.

III.1.2. La Microscopie à Force Atomique

Un microscope à force atomique (AFM pour "*Atomic Force Microscope*" en anglais) utilise une sonde afin d'étudier la topographie de la surface d'un échantillon. La technique repose sur l'analyse de la surface point par point via le balayage d'une pointe très effilée (apex nanométrique) dont les atomes de l'apex interagissent par attraction/répulsion avec les atomes surfaciques de l'échantillon. La pointe est positionnée à l'extrémité libre d'un micro-levier

flexible pouvant se déplacer dans toutes les directions. Pendant le balayage (x,y) de la surface, les flexions du micro-levier sont mesurées grâce à un laser orienté de manière à être réfléchi par l'extrémité du levier sur une photodiode (**Figure B.6 (a)**). De cette façon, le parcours exact de la pointe est enregistré en (x,y,z). L'analyse des flexions du micro-levier permet également de mesurer les forces d'interaction pointe/surface d'échantillon et d'en déduire des grandeurs physiques caractéristiques de la surface sondée (résistance mécanique, capacité, charge...). La forme de la pointe joue un rôle important pour la précision des images. Le rayon de courbure de l'apex ne doit pas être trop élevé comparé à la taille des objets étudiés ou du niveau de résolution exigé (**Figure B.6 (b)**). Des artefacts peuvent aussi survenir lorsque des débris restent accrochés à l'extrémité de la pointe

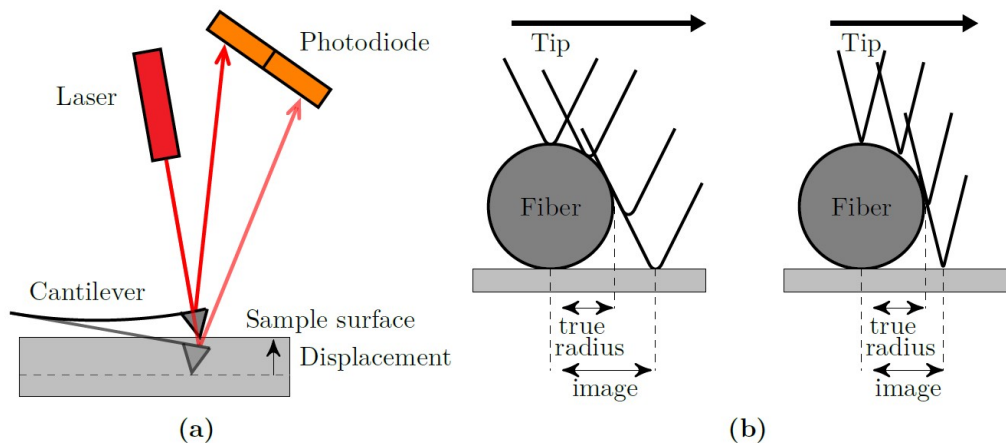


Figure B.6 : (a) Vue latérale schématisée de l'ensemble levier-pointe d'AFM avec le montage optique permettant l'analyse continue de la position de la pointe. (b) Schéma montrant l'importance du profilage de la pointe. Une image AFM réalisée avec une pointe de grand rayon de courbure (à gauche) présentera des artefacts grossissants les objets sondés plus importants qu'avec une pointe plus affinée (à droite).

Toutes les images de HET sous ses différentes morphologies ont été effectuées avec le mode "contact intermittent" (ou "tapping") de l'AFM afin d'éviter de détériorer l'échantillon avec un contact trop prolongé de la pointe avec la matière molle de ces échantillons biologiques. Dans ce mode, le bras de levier, qui oscille à sa fréquence de résonnance avec une amplitude définie, entre en contact avec l'échantillon par courtes intermittences. L'amplitude de vibration est modifiée en fonction du relief rencontré par la pointe à cause des forces d'interaction pointe/surface. Lorsqu'une de ces variations est détectée, la hauteur de la position du levier est redéfinie afin de retrouver l'amplitude assignée. Cette technique a été utilisée pour l'étude de l'aspect des films "sec" de HET sous toutes ses formes (monomère, fibres simples, faisceaux de fibres obtenus par saut de pH), avec un AFM Dimension1 Icon (Bruker) placé en boîte à gant (atmosphère air). Pour les images des **Figures B.4 et C1**, le modèle des pointes montées sur l'AFM est ScanAsyst (Bruker) et les images ont été traitées avec le logiciel NanoScope Analysis (v 1.5). Pour les images de la **Figure C.23**, des pointes Nanosensors PNP-TRS (NanoAndMore GmbH) ont été utilisées et les données traitées avec les logiciels NanoScope Analysis (v 1.7) et SPIP 6.0.3.

III.2. Etude la structure de fibres HET : Diffusion des rayons-X et des neutrons

III.2.1. Principe de base

Les techniques basées sur la diffusion des rayons X (RX) ou des neutrons par la matière sont des outils très puissants et largement utilisés pour étudier la structure interne des matériaux. Une expérience de diffusion consiste à mesurer la déviation d'une radiation collimatée par rapport à sa trajectoire rectiligne après avoir interagit avec un matériau dont les éléments de structure sont du même ordre de grandeur que sa longueur d'onde. La diffusion des RX et des neutrons donnent des informations complémentaires sur la matière puisque les RX, qui sont des ondes électromagnétiques, interagissent avec les nuages électroniques des atomes tandis que les neutrons interagissent directement avec leurs noyaux. Ainsi, lorsque la radiation rencontre un échantillon, l'onde peut être diffusée par les électrons ou les noyaux des atomes suivant le type de radiation utilisé. Un détecteur recueille les ondes diffusées, générant un diagramme de tâches de diffusion directement lié à la structure interne de l'échantillon (**FigureB.7**).

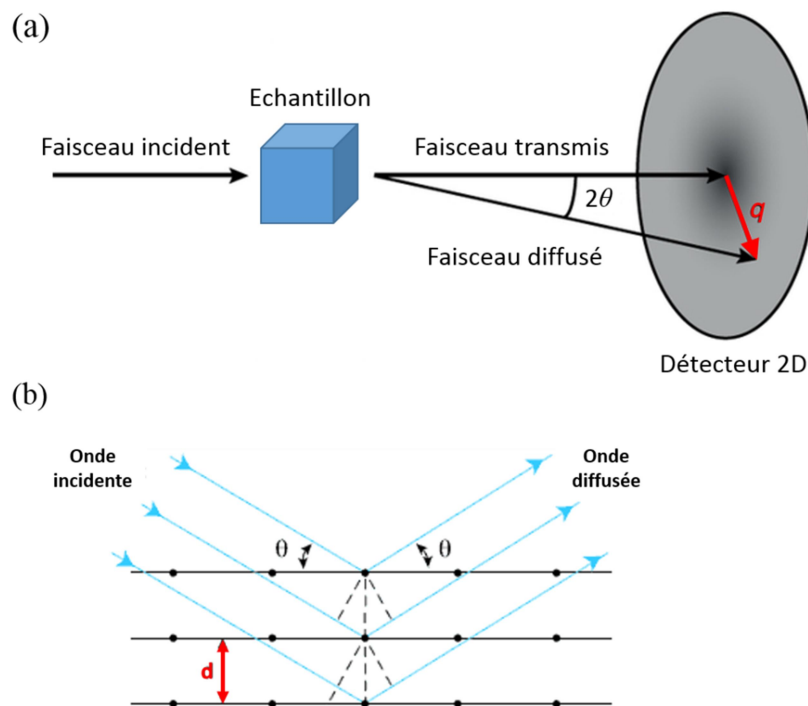


Figure B.7 : (a) Schéma présentant le principe d'une expérience de diffusion d'une radiation par un échantillon (b) Schéma représentant l'organisation des atomes (points) d'un matériau cristallin. Les atomes forment des plans espacés de la distance d selon lesquels l'onde incidente est diffusée avec un angle θ . L'onde diffusée est détectée à une distance q du centre du détecteur 2D.

Par exemple, dans le cas idéal de diffusion des RX sur un solide cristallin, les atomes sont espacés régulièrement et leur organisation périodique peut être complètement décrite par des

plans imaginaires espacés d'une distance d (**Figure B.7 (b)**). Les diagrammes de diffusions acquis avec ce type de matériaux sont composés d'un ensemble de tâches de diffusion particulièrement bien définies appelées tâches ou pics de Bragg, on parlera alors de diffractogramme. Chaque tâche de Bragg est décrite dans l'espace réciproque du diffractogramme par un vecteur $\vec{q}$ dont l'origine est située au centre du diffractogramme. Son module est directement relié à la distance inter-planaire d de l'espace réel par la relation $|\vec{q}| = 2\pi/d$. Ainsi, une tâche à une distance q du centre du diagramme témoigne de l'existence d'un élément de structure de période d dans l'échantillon. Son argument est lié à l'orientation du plan par rapport à la radiation incidente.

Alors qu'on parle de "diffraction" dans le cas de matériaux cristallins, on emploiera plutôt le terme "diffusion" pour les matériaux possédant une structure plus désordonnée et pour lesquels il n'est par conséquent pas possible d'obtenir de diffractogramme aussi précis que pour les premiers. En effet, étant donnée l'orientation aléatoire des molécules constituant ces échantillons partiellement ordonnés ou carrément amorphes, une moyenne spatiale doit être calculée ce qui conduit à une perte d'information par rapport à la cristallographie. La diffusion des RX et des neutrons apporteront alors des informations sur la forme, la taille et l'orientation d'éléments de structure caractéristiques de l'échantillon.

La diffusion aux petits angles (appelée ainsi car les rayons sont réfléchis avec un angle faible par rapport à la radiation incidente) permet d'étudier la structure d'objets de taille plutôt élevée allant du nanomètre au micromètre et n'exige pas d'échantillon cristallin ce qui est un réel avantage pour les macromolécules, surtout biologiques. En effet, avec cette technique, les échantillons peuvent être analysés sous la forme liquide, solide, en gel, en poudre etc..., dans le cas des RX comme des neutrons. De plus, c'est une technique non destructive, ce qui est encore un avantage pour l'étude d'objets fragiles comme les molécules biologiques. On parle respectivement de SAXS et SANS pour la diffusion des RX et des neutrons aux petits angles ("*Small Angle X-ray, resp. Neutron, Scattering*" en anglais).

III.2.2. Préparation des échantillons de fibres HET pour la diffusion/diffraction des rayons X et des neutrons

La structure des fibres HET a été étudiée grâce à des expériences de diffusion des RX et des neutrons sur des échantillons de fibres HET alignées préparés selon un protocole fréquemment utilisé pour les fibres amyloïdes^{155,156}. Une goutte d'échantillon (entre 30 et 40 μL) très concentré (entre 700 μM et 1 mM) de fibres HET est suspendue et laissée sécher à atmosphère ambiante entre deux pointes (deux cônes en plastique pour pipette dont les pointes ont été recouvertes de cire d'abeille hydrophobe) espacées d'environ 1 mm (**Figure B.8 (a)**). Au cours du séchage, les efforts de tension au sein de la goutte provoquent l'alignement des fibres. Il est également possible d'agrandir légèrement l'écartement des pointes tant que la goutte n'est pas totalement sèche pour améliorer cet alignement. Cette technique permet d'obtenir un échantillon solide cylindrique de diamètre de 300-500 μm environ et de longueur comprise entre 2 et 3 mm, constitué de fibres alignées (**Figure B.8 (b)**). Ce procédé ne

fonctionne pas avec les échantillons de monomères, seules les fibres ont été étudiées de cette façon.

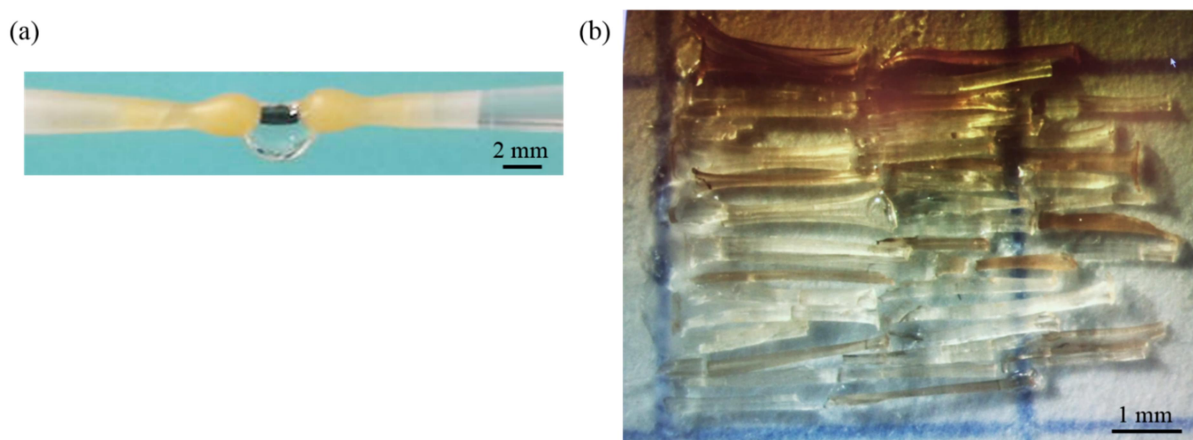


Figure B.8 : (a) Goutte d'échantillon de fibres HET suspendue entre deux pointes recouvertes de cire. En séchant, les fibres s'alignent et un fagot solide de fibres aligné est formé. (b) Plusieurs fagots de fibres HET alignées collées sur une feuille de mica pour les expériences de diffusion des neutrons.

III.2.2. i) La diffusion des rayons-X

Les expériences de diffusion des RX ont été réalisées par le Dr. T.G. Dane et le Dr. P. Rannou (UMR5819-SyMMES) au synchrotron européen de Grenoble (ESRF) sur la ligne ID13 adaptée à l'étude par diffraction et SAXS de polymères, fibres et tissus biologiques, nano-composites, etc... . Un balayage d'une surface de $80 \times 320 \mu\text{m}^2$ d'un cylindre de fibres alignées a été réalisé avec un microfaisceau de RX de dimensions $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, de longueur d'onde $0,95 \text{ \AA}$ et d'énergie 13 keV (**Figure B.9**). Un cliché de diffraction a été acquis pour chaque pas de $2 \mu\text{m}$, et une image moyenne est calculée (**Figure C.16**).

III.2.2. ii) La diffusion des neutrons

Les expériences de diffusion des neutrons ont été réalisées à l'institut Laue-Langevin (ILL) de Grenoble avec les Dr. T. Forsyth, Dr. B. Demé et Dr. E. Mossou sur les instruments D16 et D19. L'instrument D16 est consacrée à l'étude d'objets de grandes dimensions et de structures partiellement organisées, notamment avec une géométrie verticale (nanotubes, structures fibrillaires, matériaux stratifiés, intercalés entre des couches, membranes 2D, etc...). L'échelle de distance q dans l'espace réciproque balayée par l'instrument va de $0,01$ à $2,5 \text{ \AA}^{-1}$ ce qui en fait un intermédiaire entre les diffractomètres classiques et les instruments spécifiques à la diffusion aux petits angles. Il permet la détection d'organisations de périodes de quelques angströms jusqu'à une centaine d'angströms. La ligne est également équipée d'une chambre à atmosphère contrôlée, la température et le taux d'humidité peuvent notamment être finement régulés, grâce à laquelle l'impact de ces deux paramètres sur la structure des fibres HET a pu être étudié.

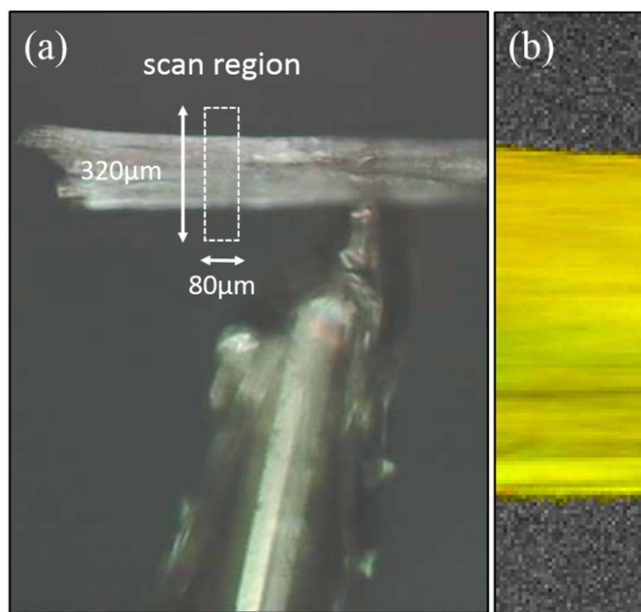


Figure B.9 : (a) Fagot de fibres HET alignées positionné au bout d'une pointe en verre pour les expériences de diffusion des RX. La région de l'échantillon balayé par le faisceau de RX est indiquée par le rectangle en pointillés. (b) Zoom (Microscopie Optique Polarisée) sur la région scannée par le faisceau. Un diffractogramme est acquis pour chaque pixel ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$).

L'instrument D19 est pourvue d'un diffractomètre pour les grandes structures notamment pour les protéines, structures biologiques, polymères... et est également bien adaptée à l'étude de structures fibrillaires. Il permet la détection de plus petites périodes que D16, de quelques angströms et moins. La ligne est également équipée d'une chambre permettant de contrôler l'humidité de l'atmosphère de l'échantillon mais de manière moins précise et la température n'est pas réglée.

Les expériences de diffusion des neutrons demandent une quantité d'échantillon beaucoup plus importante que pour les RX. Ainsi, plusieurs dizaines de cylindres de fibres alignées ont été collés avec une super glue du commerce (Henkel) sur une feuille de mica en respectant le meilleur alignement des fibres possible (**Figure B.8 (b)**).

Résultats & Discussions

I- Caractérisation électrique et électrochimique des fibres HET

La caractérisation électrique des fibres amyloïdes HET a été réalisée grâce à un dispositif à deux électrodes de carbone vitreux espacées de 1mm. Comme présenté dans la section **matériels et méthodes II.1.1.** de ce manuscrit, les échantillons homogènes composés de fibres isolées HET sont synthétisés dans une solution d'HCl 100μM et les échantillons de monomères HET dans une solution d'acide acétique (AcAc) 180mM. La concentration en protéine est identique dans les deux cas (ca. 300⇒600 μM). Le plus souvent possible, les mesures ont été réalisées simultanément (*i.e.* en parallèle: deux jeux d'électrodes sur un même substrat) sur ces deux types d'échantillons afin de permettre une comparaison directe des résultats et de mettre en évidence l'effet de l'organisation de la protéine en fibres. Comme nous le verrons plus tard dans ce chapitre, la température (*T*) et surtout l'humidité environnante ont un impact significatif sur la conduction de ces échantillons biologiques. C'est pourquoi nous avons apporté un soin tout particulier à ce que ces conditions soient stables au cours des mesures. L'humidité relative (HR) est notamment maintenue au-dessus de 60% de façon à obtenir des niveaux de courant détectables.

I.1. Caractéristiques courant-tension (I-V) : effet de l'organisation en fibres

Comme initiées par le Dr. Lucie Altamura (Thèse UGA, soutenue publiquement le 27/01/2015), les caractéristiques *I-V* des échantillons de fibres et de monomères HET ont été confirmées. L'intensité du courant traversant l'échantillon est enregistrée lors de l'application d'une différence de potentiel (DDP) à ses bornes qui varie (par pas de 5 mV) entre 0 et 3 à 5 V. Au-delà d'une tension de polarisation de 3 V, les échantillons biologiques sont susceptibles de subir des dégradations (électro)chimiques (irréversibles). Celles-ci se traduisent électriquement par une variation brutale de la résistance de l'échantillon, qui est également enregistrée pendant l'expérience ($R = V / I$), auquel cas la mesure est interrompue. Les caractéristiques *I-V* ont été acquises en parallèle pour les deux types d'échantillon, HET fibre et HET monomère (**Figure C.1 (a) et (b)**). Celles-ci révèlent des comportements électriques très différents dans la gamme de tension concernée (**Figure C.1 (d)**). En effet, le film de protéine HET sous la forme de monomères non organisés présente une caractéristique linéaire tandis que l'échantillon où la protéine est organisée sous la forme de fibres exhibe un comportement plus complexe comme en attestent les différentes pentes du tracé *I-V*. Ces observations ont été répétées pour plus de

dix échantillons de fibres et de monomères attestant de la reproductibilité des comportements courant/tension observés.

La concentration en ions des échantillons pouvant avoir un effet non négligeable sur la conductivité électrique, l'expérience a été répétée pour des films de monomères et de fibres obtenus à partir de la même préparation dans l'acide acétique (AcAc 180mM) (**Figure C.1 (e)**). En effet, en laissant sécher lentement une goutte d'échantillon de monomères entre les électrodes, des fibres ont le temps de se former probablement à cause des interactions avec la surface et/ou de l'effet de concentration. Par contre, si la même goutte est séchée rapidement, la protéine reste sous la forme de monomères (cf. **matériels et méthodes II.1.1.** et **Figure C.1 (b) et (c)**). La concentration ionique des deux échantillons est donc cette fois identique. La caractéristique I - V des fibres ainsi formées est analogue à celle des fibres traditionnellement synthétisées dans l'HCl 100 μ M. Cependant, il convient de noter que le niveau de courant global est légèrement plus élevé lors de cette mesure, tout en restant dans la même gamme : 1-100 nA. On relève également que les niveaux de courant passant au travers des échantillons de fibres, compris entre 1 nA et 100 nA, sont plus élevés qu'avec les monomères : 100 pA-10 nA dans la gamme de tensions explorées. Cette observation reste valide même dans le cas des fibres obtenues classiquement dans l'HCl avec une concentration ionique très inférieure à celle des monomères (100 μ M contre 180 mM).

Ces résultats montrent que l'organisation de la protéine HET en fibres amyloïdes autorise l'établissement d'un ou plusieurs processus de transfert de charges au sein du film. Cela se traduit par un niveau de conductivité supérieure ainsi que par une caractéristique I - V différente du cas où la protéine n'est pas organisée (monomères). En particulier, la mesure présentée **Figure C.1 (e)** montre clairement que seule l'organisation supramoléculaire de la protéine peut expliquer cette différence. Le tracé des caractéristiques I - V dans une représentation doublement logarithmique souligne la présence de différentes ruptures de pente dans la caractéristique I - V des films de fibres HET. De plus, cette représentation permet de décrire les courbes avec une fonction $I \propto V^a$.

Dans le cas des monomères, le courant est directement proportionnel à la tension appliquée ($a = 1$) sur toute la gamme de tension étudiée. Cela s'apparente à un comportement électrique de type ohmique. Cette conduction est attribuée à la diffusion d'ions issus de la solution de préparation des monomères (eau Δ + AcAc 180 mM) restés piégés dans le film. En effet, le transport de charge par diffusion donne une conduction typiquement ohmique.

Concernant les films de fibres, différents régimes de conduction délimités par plusieurs ruptures de pente sont visibles (**Figure C.1**). Au moins deux régimes de conduction sont systématiquement observés. Le premier (régime I), typique des faibles tensions (DDP < 1 V), est défini par une valeur de a généralement proche de 1 ce qui ressemble à la caractéristique d'une conduction ohmique, similairement au cas des monomères. En augmentant la DDP jusqu'à environ 3V, la pente de la caractéristique atteint des valeurs de a comprises entre 2 et 3, ce qui est spécifique du régime II. Au-dessus de 3V, à mesure que la DDP augmente, la pente peut encore s'accroître au-delà de 3 avant de fréquemment redescendre en dessous de 2. Cependant, le comportement électrique des échantillons dans cette gamme de fortes tensions est plus aléatoire et instable. Les paramètres correspondants à ces différents régimes sont résumés dans le **Tableau C.1**.

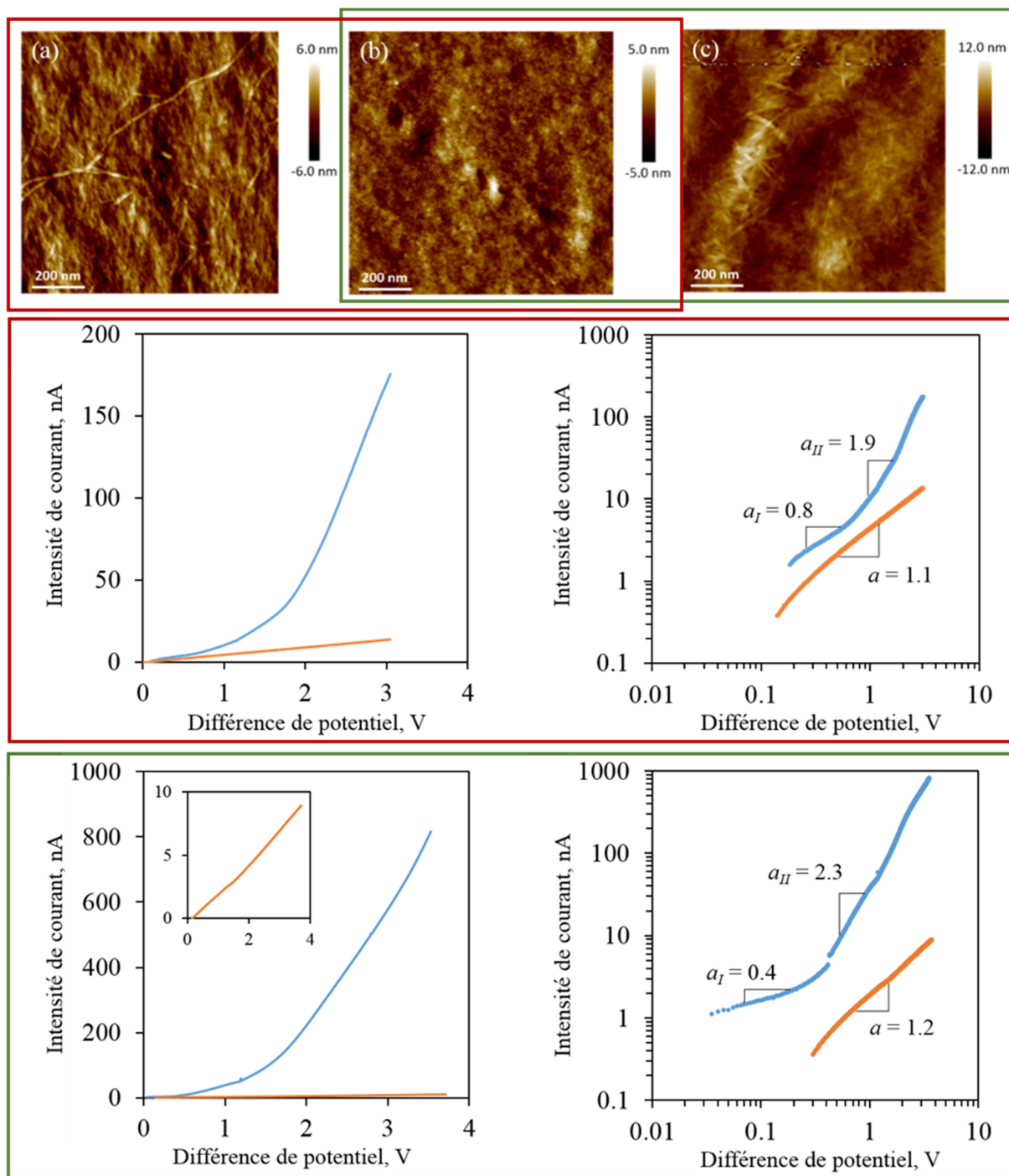


Figure C.1 : (a), (b) et (c) : Images de microscopie à force atomique (AFM) de films sec de protéine HET respectivement sous forme de fibres monobrins isolés (HCl 100 μ M), de monomères (AcAc 180 mM) et de fibres (AcAc 180 mM). La concentration en protéine de ces échantillons est comprise entre 300 et 600 μ M. (d) Caractéristiques I - V des fibres amyloïdes HET monobrins isolés correspondantes à l'image (a) (courbe bleu) comparé aux monomères (image (b)) (courbe orange) tracée dans des représentations linéaire (gauche) et doublement logarithmique (droite). (e) Caractéristiques I - V des fibres correspondantes à l'image (c) (en bleu) et des monomères (orange). Dans ce cas, les échantillons de fibres et de monomères proviennent de la même préparation (la concentration ionique, AcAc 180 mM, est identique), seule l'organisation supramoléculaire des protéines est différente.

	Pente a	DDP de transition (V)
Régime I	$0,94 \pm 0,33$	$0,92 \pm 0,29$
Régime II	$2,48 \pm 0,66$	
Régime III	$3,10 \pm 1,2$	$1,80 \pm 0,41$

Tableau C.1 : paramètres des caractéristiques I - V des fibres HET extraits à partir des représentations doublement logarithmiques issues de 35 mesures I - V sur plus de 10 échantillons. Les régimes de conduction I et II sont toujours présents.

1.1.1. Conduction électronique... ?

Ce type de comportement électrique peut s'apparenter à celui d'un matériau semi-conducteur électronique dont les mécanismes de conduction peuvent être décrits grâce au modèle de courant limité par la charge d'espace (SCLC : space charge limited current) (**Figure C.2**). Ce modèle est habituellement utilisé pour décrire le comportement électrique des semi-conducteurs à grand gap (E_g comprise entre 2 et 4 eV) qui possèdent une faible densité n_0 de porteurs de charges thermiquement activés¹⁵⁷. En particulier, le modèle SCLC est fréquemment utilisé pour l'étude des semi-conducteurs organiques^{158,159}.

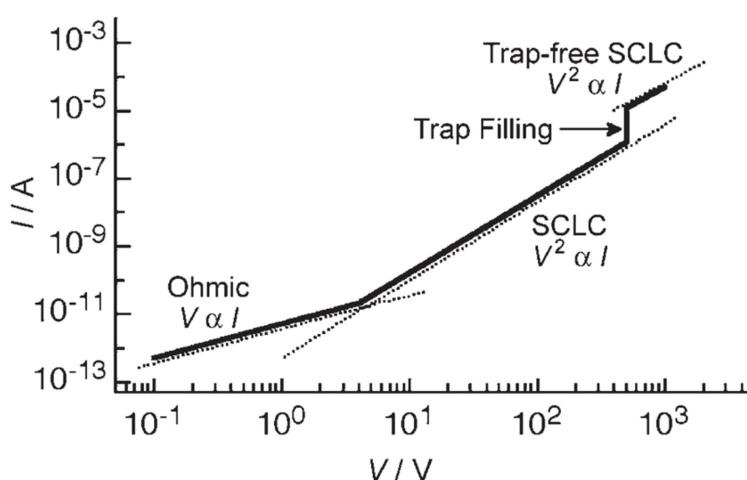


Figure C.2 : Représentation schématique des différents régimes pouvant être observé lors de mesures I - V deux points d'un film fin d'un matériau semi-conducteur. Celui-ci montre 4 régimes typiques d'un comportement électrique limité par la charge d'espace : comportement ohmique à faibles DDP, puis en augmentant la polarisation électrique, le courant devient limité par la charge d'espace (régime SCLC). A plus haute DDP, une fois tous les « pièges » électroniques remplis, le régime SCLC sans pièges est atteint.

C'est ce modèle qui avait initialement proposé par le Dr. Lucie Altamura pour expliquer les mécanismes de conduction de nos échantillons de fibres. En effet, avec des valeurs de conductivité comprises entre 10^{-10} S.cm⁻¹ (HR = 40 % ; T = 25°C) à 10^{-7} S.cm⁻¹ (HR = 70 % ; T = 25°C) pour les films de monomères et entre 10^{-9} S.cm⁻¹ (HR = 40 % ; T = 25°C) à 10^{-7}

⁶ S.cm⁻¹ (HR = 70 % ; T = 25°C) pour les films de fibres (valeurs calculées à partir des courbes *I-V* de la **Figure C.7**), ces matériaux peuvent être considéré comme semi-conducteurs à grand gap.

La caractéristique *I-V* typique d'un comportement SCLC présente quatre régimes de conduction : i) un régime ohmique à faible DDP ($I \propto V$). Le courant est uniquement dû au mouvement des porteurs thermiquement activés. ii) En augmentant la DDP aux bornes de ces matériaux peu conducteurs, un excès de charges est injecté. Ces charges "diffusant" mal dans le matériau, une charge d'espace apparaît au voisinage de l'électrode injectrice. Dès que sa densité dépasse n_0 , le courant devient contrôlé par la charge d'espace. On parle alors du régime de courant limité par la charge d'espace (SCLC) et l'intensité de courant est reliée à la tension par la loi de Mott-Gurney. Dans la configuration géométrique coplanaire correspondante à notre cas où l'épaisseur du film ($\sim 6 \mu\text{m}$) est faible devant le gap des électrodes (1 mm), celle-ci s'exprime par la relation suivante^{157,158} :

$$I = \frac{2\mu\epsilon_0\epsilon_r W}{\pi} \left(\frac{V^2}{L^2} \right) \quad \left| \begin{array}{l} \text{Avec } \mu \text{ la mobilité des porteurs de charge, } \epsilon_0 \text{ la permittivité} \\ \text{du vide, } \epsilon_r \text{ la constante diélectrique du matériau, } W \text{ la} \\ \text{largeur des électrodes et } L \text{ le gap entre les électrodes.} \end{array} \right.$$

Dans le régime SCLC, des niveaux énergétiques, ou pièges électroniques, principalement induits par les défauts présents dans le matériau, sont progressivement remplis avec l'augmentation de la tension de polarisation. iii) Lorsque tous ces pièges sont remplis, on assiste à une forte et brève augmentation du courant. iv) Enfin, le régime SCLC sans pièges est atteint. Le courant électrique est alors proportionnel à la tension ou au carré de la tension de polarisation suivant la nature du contact électrode/semi-conducteur, respectivement ohmique ou non (barrière de Schottky).

1.1.2. ...ou protonique ?

Alternativement, la forme de cette caractéristique *I-V* peut également rappeler celle d'une réaction de catalyse électrochimique. La gamme de tension étudiée dans nos études comprend des tensions élevées et, bien que la protéine HET ne contienne pas de groupes actifs d'un point de vue électrochimique dans la gamme de tension étudiée, des réactions faisant intervenir les molécules d'eau présentes dans le film ne sont pas à exclure. En effet, les films de protéine sont ici décrits comme étant "secs" mais contiennent toujours de l'eau résiduelle piégée ainsi que les molécules d'eau participant au maintien de la structure des protéines ou à leur couche d'hydratation. La réaction de dissociation de l'eau par électrolyse est notamment possible à partir d'une DDP théorique de 1,23 V qui est incluse dans cette gamme de tension. Dans ce cas, le courant serait dû à flux de protons issus de cette réaction. Cette hypothèse est parfois évoquée pour expliquer l'accroissement exponentiel au-delà de 1V de la conductivité de matériaux biologiques où une conduction protonique est suspectée, comme par exemple dans l'étude de Kleine-Ostmann T. *et al*¹⁶⁰ sur la conductivité de films d'ADN déposés entre deux électrodes d'or de gap 100nm. Cependant, à notre connaissance il n'a jamais été reporté de preuves de l'existence de cette réaction.

La structure des fibres HET est connue (résolution d'une fibres composée de 5 sous-unités par RMN du solide¹¹⁹) et autorise ces deux types de conductivité. Dans l'hypothèse d'un transport d'électrons, il est possible que celui-ci soit supporté par la présence des résidus aromatiques ainsi que des résidus chargés organisés périodiquement à la surface des fibres. En effet, ces résidus (particulièrement les aromatiques) favorisent le mécanisme de transport d'électrons par sauts en jouant le rôle de "relais" pour les électrons. Les interactions de van der Waals (empilements π) entre noyaux aromatiques favorise également la délocalisation électronique. Ces mécanismes (délocalisation et saut d'électrons) ont par exemple été proposés pour expliquer la conduction électronique des pilis et nano-fils bactériens^{78,79}. En revanche, les films de monomères ne présentent pas d'organisation favorable à ce mécanisme. Dans l'éventualité d'un transport de protons, celui-ci peut se produire grâce à la présence de molécules d'eau via les mécanismes de diffusion ou de type Grotthuss, comme proposé pour de nombreux matériaux biologiques (protéines⁸⁹, ADN¹⁶⁰, sucres³²...). En effet, les chaînes latérales hydrophiles sont orientées vers l'extérieur de la fibre. Ainsi, il est possible que des mécanismes de conduction protoniques, soient favorisés par l'adsorption d'eau à la surface des fibres. Un transport ionique est également possible par diffusion, en particulier dans les films de monomères plus riches en sels (AcAc 180 mM contre HCl 100 μ M pour les fibres) (Figure C.3).

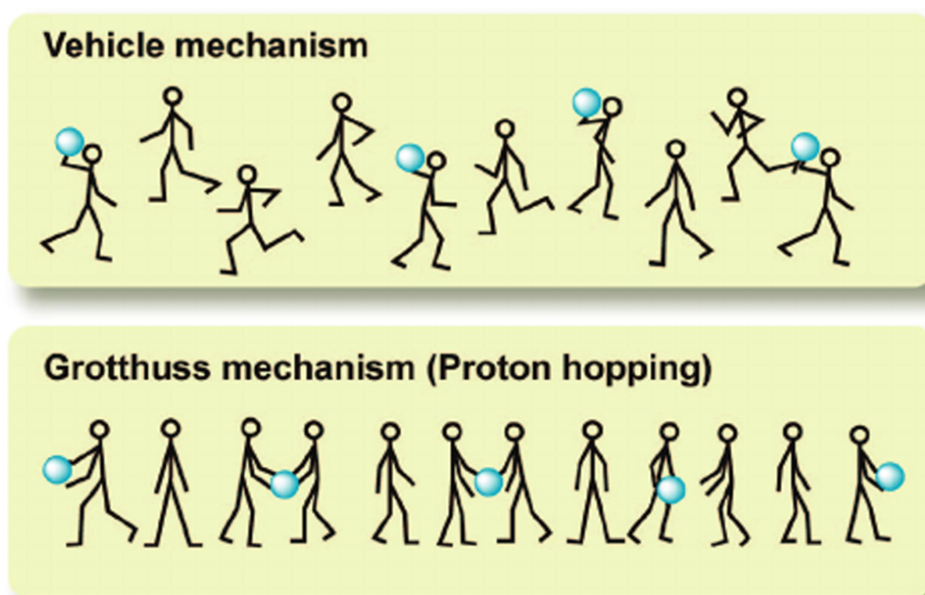


Figure C.3 : Schéma représentant le principe des deux processus de transport de protons connus : le transport véhiculaire (haut) où les protons sont transportés par des ions diffusants et le mécanisme de Grotthuss (bas) où les protons sont transférés par sauts entre molécules, essentiellement H_2O , liées par liaisons-H. Cf. partie d'Introduction I.3.3. pour plus de détails.

Tiré de Ueki T. et Watanabe M.³¹

I.1.3. Difficile distinction entre conduction électronique et protonique

Comme décrit en introduction (cf. **Introduction II.2** et **II.3**), la discrimination entre les processus de transport électronique et protonique est difficile. En effet, les mécanismes de transport d'électrons et de protons dans les matériaux biologiques, par saut dans le cas des électrons et par saut (processus impliqué dans le mécanisme de Grotthuss) et/ou diffusion dans le cas des protons, ont des caractéristiques assez similaires, notamment vis-à-vis de la température et de l'humidité⁷¹. Premièrement, ces mécanismes sont tous activés thermiquement. Ensuite l'humidité, en hydratant les échantillons, peut avoir une influence considérable dans les deux cas. Cela est assez évident dans le cas de la conduction de protons dont les mécanismes possibles dépendent grandement de la présence d'eau dans l'échantillon, que ce soit la diffusion ionique ou pour permettre le mécanisme de Grotthuss. Les molécules d'eau constituent alors des chemins percolants conducteurs pour les protons: la conductivité des échantillons dépend alors de l'hydratation selon une loi de puissance. Dans le cas de la conduction d'électrons, il a été avancé que l'absorption d'eau dans l'échantillon provoque l'augmentation locale de la constante diélectrique du matériau, ce qui améliore sa conductivité¹⁶¹. Selon Rosenberg, la variation de la conductivité du matériau en fonction de l'humidité est alors exponentielle jusqu'à saturer à partir d'un seuil humidité.

Remarque 1 :

Plusieurs mesures I - V successives du même film de protéine peuvent-être effectuées sans constater de modification significative de son comportement électrique dans la gamme de tension étudiée (**Figure C.4 (a)**). Après plusieurs mesures, on observe habituellement une légère diminution de la pente α , surtout dans le deuxième régime. Une faible diminution du niveau de courant global peut également avoir lieu. Ces échantillons biologiques semblent donc bien résister aux champs électriques auxquels ils ont été soumis. En particulier, on ne remarque pas d'altération chimique (irréversible) entre deux mesures successives. Cependant, il existe un effet capacitif particulièrement notable. En effet, lorsque l'on continue d'enregistrer le courant traversant le film après arrêt de la polarisation, un courant de signe opposé et décroissant lentement est détecté (**Figure C.4 (b)**). Ce phénomène se produit avec n'importe quel type de film de fibres ou d'oligomères. Cela est certainement dû à une polarisation ionique provoquée par le déplacement des ions présents dans les films lorsqu'un champ électrique est appliqué. Après l'interruption de ce dernier, les espèces ioniques se réorganisent à l'aide de l'agitation thermique, tendant progressivement vers l'équilibre électrique du film. Cette relaxation est relativement longue (plusieurs dizaines de minutes). Elle est également responsable du fait qu'on ne retrouve pas exactement les mêmes niveaux de courant entre deux mesures I - V successives pour les DDP très faibles ($< 0,5$ V), les premières valeurs de courant du deuxième enregistrement pouvant même être négatives (**Figure C.4 (a) encart**).

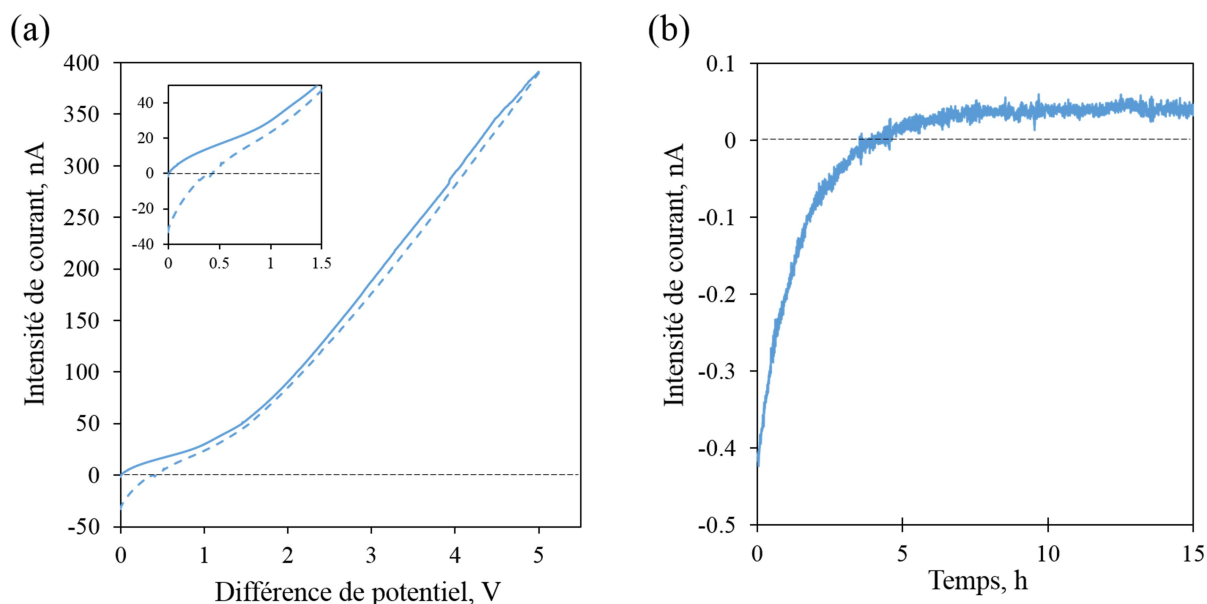


Figure C.4 : (a) Deux mesures successives de la caractéristique I - V d'un même film de fibres HET. Un effet capacitif à basse tension $< 0,5$ V (encart). Cet effet est également observé pour les I - V obtenus avec les films de monomères. (b) Effet capacitif d'un film de fibres HET. Une décharge progressive de courant est enregistrée (DDP = 0V) après polarisation du film à 3V (conditions de température et d'humidité stables).

Remarque 2 :

Une partie des expériences présentées dans ce manuscrit ont été menées de la manière suivante : l'intensité de courant est enregistrée au cours du temps ($I-t$) au rythme d'un point par seconde avec une DDP fixée (une tension de polarisation), pendant qu'un paramètre d'étude est modifié. Une mesure $I-t$ typique obtenu avec un échantillon de fibres et une DDP de 3V dans des conditions de mesure stables est présenté sur la **Figure C.5**. Une décroissance rapide du courant est observée pendant les premières minutes après avoir fixé une DDP non nulle, suivit d'une décroissance beaucoup plus lente. Cette décroissance, très graduelle, perdure plusieurs heures et la courbe $I-t$ ne semble jamais atteindre de plateau. La forte décroissance initiale peut-être expliquée par la polarisation rapide de l'échantillon qui s'opère dès l'instauration de la tension de polarisation. Les échantillons de monomères produisent le même type de décroissance. Ce phénomène est pris en compte dans les protocoles de mesure : lorsque des mesures $I-t$ sont réalisées, les dix premières minutes ne sont pas prises en compte. Après cette durée, on considère le courant comme stabilisé.

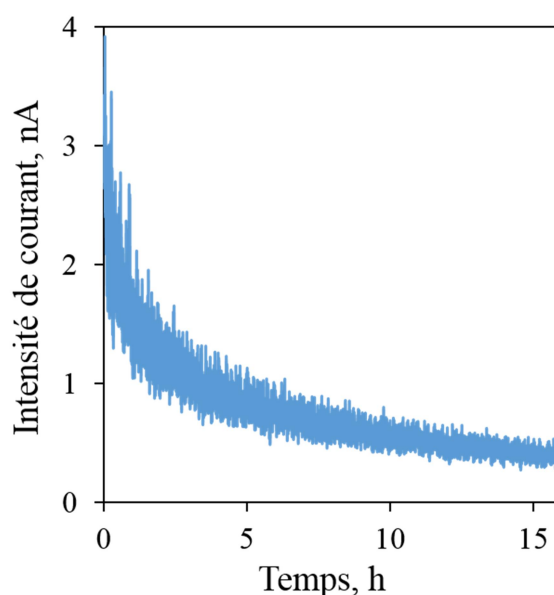


Figure C.5 : Exemple d'une mesure courant-tension ($I-t$) enregistrée pour un film de fibres HET à une tension de polarisation égale à 3 V et à température et humidité stable ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$; HR = 55 %).

I.2. Rôle prédominant de l'eau sur la conductivité

Dans la suite de ce chapitre, on se focalise sur l'étude des deux premiers régimes de conduction invariablement observés et identifiés comme suit: régime I pour des valeurs de DDP inférieures à 1 V et régime II pour des DDP supérieures à 1 V. L'impact de la température et de l'humidité sur la conduction des fibres HET a été étudié et comparé avec la forme de HET monomère. Ces paramètres sont révélateurs des mécanismes de transport de charges dont nos matériaux biologiques sont le siège. A cet effet, une enceinte à atmosphère contrôlée (Climacell 111, MMM Group) permettant de programmer les niveaux de température (T) et d'humidité relative (HR) désirés a été utilisée.

Dans la suite, on constatera qu'à conditions de mesures analogues la conductivité des films de fibres est plus élevée que celle des monomères (comme ce qui a déjà été observé lors des mesures I - V précédentes).

I.2.1. Effet de l'humidité sur la conductivité des fibres et monomères HET

L'effet de l'humidité sur la conduction est remarquable, en particulier pour les fibres HET. Deux expériences le soulignent.

I.2.1. i) Effet de l'humidité : I - t

Dans la première, l'effet de l'humidité a été étudié de la même manière que l'effet de la température présenté et discuté précédemment. L'intensité de courant traversant l'échantillon au cours du temps est mesurée alors que l'humidité relative de l'enceinte varie (par pas de 5%) de 30 à 80% et de 80 à 30%. La température reste stable à 30°C et la DDP est fixée à 0,8 ou 3,0V (**Figure C.6 (a)**). La durée d'un pallier est ici de 30 minutes (la stabilisation de l'HR dans l'enceinte est bien plus rapide que pour la température). L'intensité de courant est relevée dans les dix dernières minutes du pallier considéré. Deux montées/descentes d'HR sont effectuées à la suite pour un même échantillon et la dépendance est reproductible.

Cette expérience a été répétée à de nombreuses reprises pour les fibres HET mais seulement deux fois avec les échantillons de monomères. En effet, les mesures électriques de ces derniers sont moins souvent exploitables du fait des faibles niveaux de courant les traversant, ce qui rend leur détection difficile. Par contre, les données obtenues avec les fibres sont très reproductibles pour plus de 10 échantillons testés pour une DDP de 3 V et 5 échantillons testés à 0,8 V.

De plus, il faut remarquer que pour être plus juste, ces courbes devraient être tracées en fonction de la quantité d'eau adsorbée par les échantillons plutôt qu'en fonction de l'humidité relative. En effet, l'adsorption de l'eau par les échantillons n'est pas nécessairement proportionnelle aux variations d'HR. Il faudrait donc pouvoir mesurer l'isotherme d'adsorption de l'eau par les films de fibres et de monomères. Comme nous le verrons au

chapitre suivant (**Résultats et Discussion II.2.1.**), seul un isotherme d'adsorption des fibres HET sous forme de poudre lyophilisée a pu être réalisé. Celui-ci est quasi linéaire entre 20 et 70 % d'HR. Si on estime que les films de fibres se comportent de la même façon, la forme des dépendances obtenues avec les fibres est donc correcte, seuls les deux derniers points aux HR de 75 et 80 % sont à considérer avec plus de précaution. L'isotherme d'adsorption de l'eau par les oligomères n'a pu être réalisée.

Lors de ces mesures, on remarque en premier lieu l'extrême sensibilité de la conductivité des fibres comme des monomères à l'humidité. En particulier, l'intensité de courant varie quasi-instantanément dans le même sens que les fluctuations de l'humidité comme le montre l'exemple présenté sur la **Figure C.6 (b)** obtenu avec un échantillon de fibres. Cette observation reste valide dans le cas des monomères.

La dépendance de la conductivité des fibres vis-à-vis de l'humidité est importante et similaire quel que soit le régime de conduction étudié. Presque deux ordres de grandeur sont gagnés entre 50 et 80% d'HR avec une dépendance en $e^{0,2}$ (**Figure C.6 (a)**). Concernant les films de monomères, les dépendances montrent une moindre sensibilité à l'humidité que dans le cas des fibres même si elle reste forte : la dépendance est également exponentielle. De plus, dans un cas comme dans l'autre, les niveaux de courant deviennent vraiment faibles pour les HR < 50% et atteignent fréquemment les limites de détection de l'appareil. Les mesures effectuées dans ces conditions sont très souvent non exploitables.

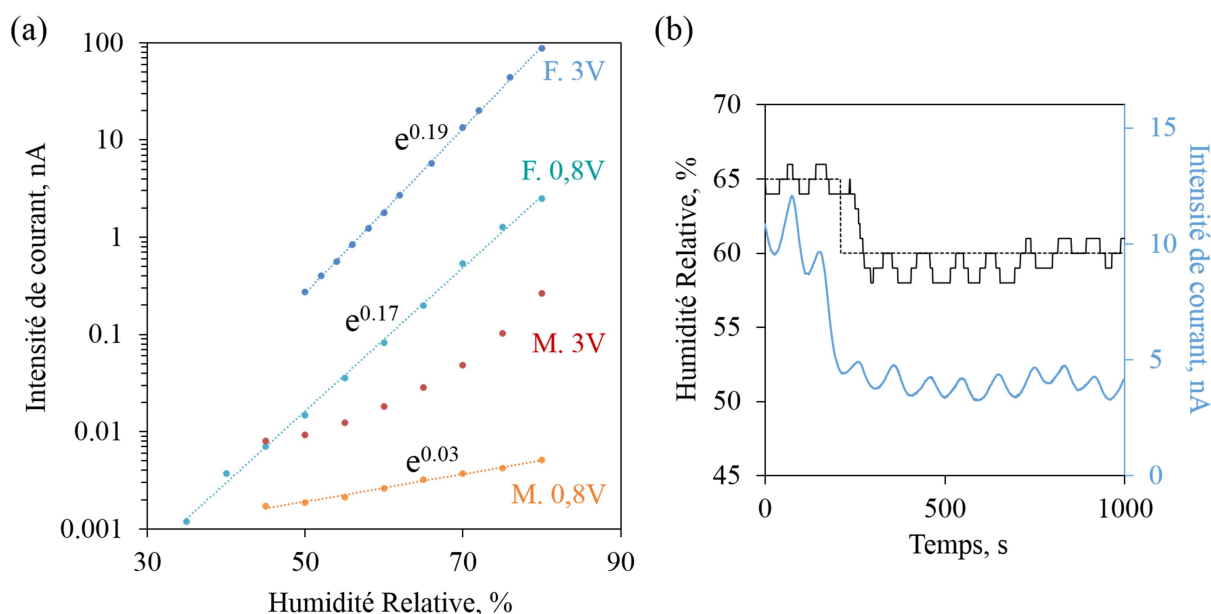


Figure C.6 : (a) Effet de l'humidité sur la conductivité des films de monomères (M, courbes rouge et orange) et de fibres HET (F, courbes bleues). Les mesures ont été effectuées à température ambiante et pour des tensions de polarisation correspondantes au 1^{er} régime (0,8V) ou au 2nd régime (3,0V) de conduction des fibres. (b) Mesure $I-t$ typique d'un film de fibres HET (en bleu) montrant l'extrême sensibilité de la conduction aux variations de l'humidité (en noir). L'humidité relative de l'enceinte climatique oscille de ± 2 % autour de la valeur consigne (en noir pointillé). L'intensité de courant traversant l'échantillon suit ces variations quasi-instantanément.

Cette (très) forte dépendance de la conductivité à l'humidité est une caractéristique partagée par les matériaux biologiques dont les propriétés conductrices ont été étudiées à l'instar de l'ADN, de pigments comme la mélanine ou encore de protéines. Comme expliqué au paragraphe **I.1.3** de cette partie, l'humidité peut fortement influencer la conduction d'électrons jusqu'à un niveau de saturation. Cependant, pareillement à nos résultats, cette saturation n'est jamais atteinte, même dans le cas des études allant plus haut en humidité (proche de 100%)^{71,160}. De plus, compte tenu de l'extrême sensibilité de la conductivité des échantillons à l'humidité, la plus grande majorité conclue à l'existence d'une conduction ionique, en particulier protonique. Certains auteurs avancent que ces matériaux sont des conducteurs mixtes, la conduction électronique dominant à basse humidité et ionique (en particulier protonique) à haute humidité^{134,162}. D'autres affirment qu'il s'agit plutôt de conducteurs "uniquement" ioniques (en particulier protoniques). Ce débat est toujours d'actualité, notamment concernant la conduction de l'ADN⁸⁶. Dans tous les cas, la conduction ionique est possible grâce à l'eau adsorbée par l'échantillon qui constitue une matrice conductrice. En respectant la théorie de la percolation, il existe une humidité seuil (dite de percolation) à partir de laquelle la quantité d'eau adsorbée est suffisante pour que la conduction protonique puisse avoir lieu, puis la conductivité croît exponentiellement avec l'augmentation de l'humidité. Les résultats obtenus avec les monomères sont en accord avec l'hypothèse d'une conduction ionique. Concernant les fibres, compte tenu de la très forte dépendance de la conductivité à l'humidité, ainsi que de la non détection de courant à basse humidité ($HR < 40\%$), il semble plus vraisemblable qu'un mécanisme de conduction protonique soit responsable de la conductivité des échantillons.

I.2.1. ii) Effet de l'humidité : I-V

Dans une seconde série d'expériences, les caractéristiques *I-V* des fibres et monomères sont réalisées pour différents taux d'HR compris entre 40 à 70%, à température ambiante (**Figure C.7**). Cette fois-ci, pour éviter les variations d'humidité dues à la régulation de l'enceinte climatique (**Figure C.6 (b)**) qui risqueraient d'engendrer des artefacts sur les courbes *I-V*, un autre dispositif est utilisé. Les échantillons sont placés dans un sac à gants dont l'atmosphère peut être plus ou moins humidifiée par apport d'air sec ou préalablement humidifié par bullage dans de l'eau distillée. Ce système permet de conserver des conditions d'hygrométrie très stables mais la température ne peut pas être régulée et sera toujours $T_{amb} \approx 25\text{ °C}$. Le taux d'humidité ainsi que la température sont vérifiés en permanence à l'aide d'une station météo (thermomètre/hygromètre 936151 / hh-22, Otio). Les échantillons sont laissés à équilibrer durant 1h dans des conditions d'humidité stables avant toute mesure.

Le comportement électrique des fibres est modifié avec l'humidité. En effet, les deux principaux régimes de conduction apparaissent de façon de plus en plus marquée avec l'augmentation de l'HR (**Figure C.7 (a)**). La pente du régime I a tendance à diminuer linéairement avec l'augmentation de l'humidité alors que la pente du régime II s'accroît, également de façon linéaire (**Figure C.7 (c)**). Les tensions de transition entre les deux régimes semblent invariables entre 0,8 et 1,0 V. A faible humidité ($HR < 50\%$), la caractéristique *I-V*

des fibres tend à ressembler à celle des monomères avec une seule pente de 1. De plus, ce phénomène est totalement réversible puisque après avoir atteint l'HR maximale de 70% et être revenu à une HR d'environ 50%. La caractéristique recouvre exactement celle mesurée lors de la phase d'hydratation (respectivement 52% ↘ et 52 % sur la **Figure C.7 (a)**), hormis un effet capacitif aux basses DDP visible sur la dernière caractéristique à HR = 50%.

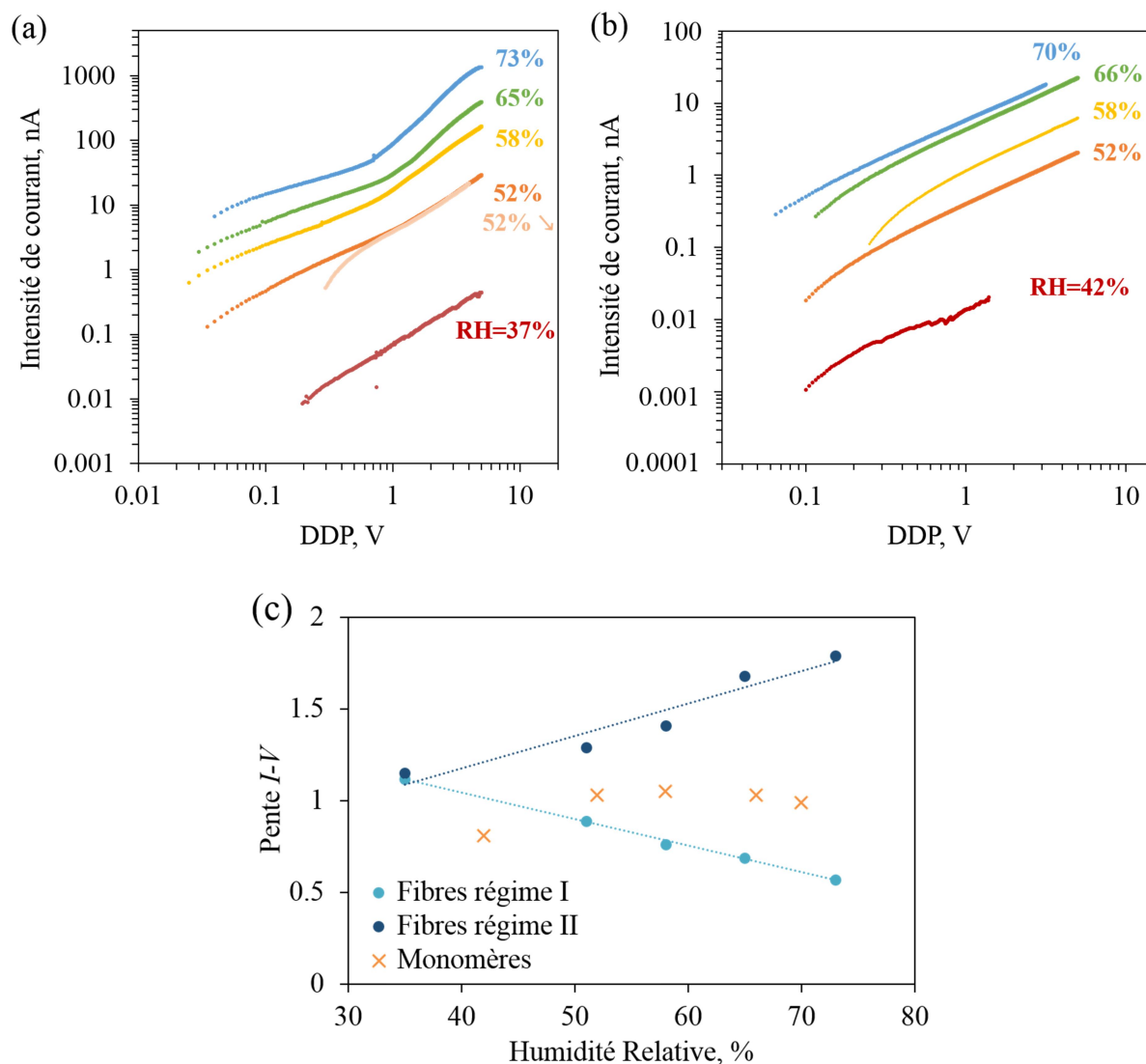


Figure C.7 : Effet de l'humidité sur les caractéristiques I - V des films de fibres (a) et de monomères (b). (c) variation des pentes de la caractéristique I - V des monomères (orange) et des fibres avec l'humidité (bleu, pente du 2nd régime de conduction et bleu clair, celle du 1^{er} régime).

Ces expériences montrent que les propriétés de conduction propres aux fibres HET nécessitent non seulement que la protéine soit organisée sous forme de fibre mais également que l'échantillon soit suffisamment hydraté. En effet, une humidité assez élevée ($> c.a. 40\%$) est nécessaire pour pouvoir observer les deux régimes de conduction caractéristiques des fibres. De plus, la modification des pentes de la caractéristique IV avec l'humidité signifie que les mécanismes de conduction sont directement affectés. En ce qui concerne les films de monomères, la pente de la caractéristique reste de 1 pour toutes les humidités testées. Le

mécanisme de conduction reste inchangé (diffusion ionique), seule la résistance du matériau est abaissée par l'humidité.

Les fibres autorisent donc clairement l'établissement d'un (ou plusieurs) mécanisme(s) de conduction différent de celui des monomères dès lors que l'humidité est assez élevée. Or, dans l'hypothèse qu'une conduction ionique domine à haute humidité, le seul type de mécanisme de transport connu autre que la diffusion ionique est le mécanisme de Grotthuss. Ce dernier concerne uniquement les protons, aucun autre processus n'est connu pour les ions "classiques".

1.2.1. iii) Hypothèse sur le type de porteur de charges

Ainsi, devant le rôle clairement prédominant de l'eau dans le(s) mécanisme(s) de transport des fibres HET, nous suggérons qu'il est plus probable que les porteurs de charges dominants au sein des films de fibres HET soient des protons plutôt que des électrons. Cela expliquerait en particulier qu'une humidité suffisamment élevée ($HR > c.a. 40 \%$) est nécessaire à l'instauration des mécanismes de conduction propres aux fibres HET.

De plus, le transport de protons pourrait être réalisé grâce au mécanisme de Grotthuss. Cela rejoint les hypothèses proposées par d'autres études concernant des molécules biologiques fibrillaires (notamment l'ADN et des peptides amyloïdes^{94,95}) possédant un comportement électrique $I-V$ similaire et dont la conductivité est également extrêmement sensible à l'humidité.

L'originalité de notre étude tient au fait d'avoir montré que c'est bien la structure supramoléculaire de la protéine sous forme de fibres amyloïdes qui permet l'établissement d'un tel mécanisme. En effet, à notre connaissance aucune étude ne compare le comportement électrique des fibres amyloïdes avec leur équivalent non organisé (*i.e.* la protéine sous forme de monomères ou oligomères). De ce point de vue, l'étude la plus proche de la nôtre compare la conductivité de films de fibres formées par le peptide (2-Thi)(2-Thi)VLKAA entre un échantillon où la protéine est partiellement fibrillé et un échantillon où la fibrillation est complète¹³⁴. Cette étude proposait qu'un mécanisme de transport de protons de type Grotthuss domine à haute humidité et montrait l'amélioration de la conductivité lorsque les fibres sont totalement fibrillées. Cependant, la gamme de DDP étudiée se limitait à 0-1 V et les deux types d'échantillons respectaient alors un comportement électrique ohmique.

1.2.2. Effet de la température sur la conductivité des fibres et monomères HET

La **Figure C.8** montre l'effet de la température (T) sur la conduction des films de monomères et fibres HET. Le courant est continuellement enregistré pendant que la température varie (par pas de 5°C) de 20 à 60°C et de 60 à 20 °C. Les paliers de température durent 50 minutes pour permettre la stabilisation atmosphérique de la chambre et l'équilibration de l'échantillon. Chaque point correspond au niveau de courant stabilisé dans les dix dernières minutes du palier de température considéré. La température affecte la conduction des échantillons de manière similaire selon une loi d'Arrhenius dans toutes les conditions testées : organisation de

la protéine, régime de conduction, taux d'humidité élevé, HR = 80% (**Figure C.8 (a)**) ou ambiante, HR = 60% (**Figure C.8 (b)**). Ces comportements signifient donc que les mécanismes de conduction ayant lieu au sein des films et dans la gamme de température étudiée sont activés thermiquement.

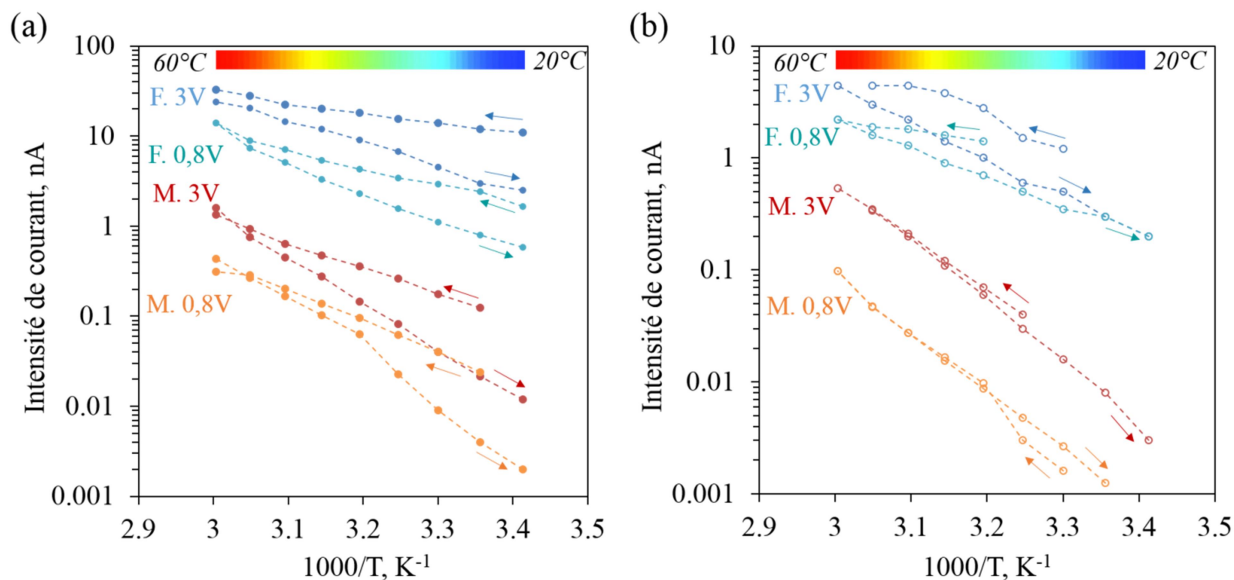


Figure C.8 : Effet de la température entre 20 et 60°C sur la conductivité des films de monomères (M, courbes rouges) et de fibres (F, courbes bleues) HET avec une HR stable de 80% (a) et 60% (b) et une DDP fixée dans le 1^{er} régime (0,8V) ou le 2nd régime (3V) de conduction des fibres.

Il faut immédiatement prendre en compte que la gamme de température investiguée est assez limitée pour pouvoir définir le comportement électrique des échantillons vis-à-vis de ce paramètre avec certitude. De plus, ces dépendances ne semblent pas tout à fait réversibles puisque les niveaux de courant ne reviennent pas exactement à leur valeur initiale après que la température soit redescendue de 60 à 20°C. Cependant, cette constatation peut aussi être reliée à un effet de la décroissance $I-t$ (**Figure C.5**) au cours du temps très long de l'expérience. Les énergies d'activation (E_a) ont néanmoins été estimées à partir de la définition de la loi d'Arrhenius reliant la mobilité μ des porteurs de charge à la température T :

$$I \propto \mu = A \cdot e^{\frac{-E_a}{k_b \cdot T}}$$

Avec k_b la constante de Boltzmann et A le facteur pré-exponentiel

L'expérience a été reproduite pour 4 à 5 échantillons dans le régime II et seulement 2 dans le régime I. Les valeurs présentées dans le **Tableau C.2** sont à relativiser du fait des variations entre échantillons qui peuvent être assez élevées, surtout dans le cas des monomères et pour la DDP de 0,8V où les niveaux de courant sont faibles. La tendance qui semble se dégager de ces résultats est que les énergies d'activation des fibres (quel que soit le régime de conduction

considéré) est légèrement inférieur à celle des monomères, (respectivement 400-600 meV contre 700 meV - 1eV). Cela suggère que les processus de conduction de ces deux types d'échantillons sont différents. Par contre, il est plus difficile de comparer les énergies d'activation entre les régimes I et II car les données ne sont pas suffisantes. Enfin, les écarts entre les valeurs d'énergies d'activation pour les deux conditions d'humidité testées ne sont pas significatifs ni dans le premier, ni dans le deuxième régime.

	HR = 80 %	HR = 60 %
Fibres / V = 0,8 V	0,53 $\pm 0,12$	0,57 $\pm 0,08$
Fibres / V = 3 V	0,36 $\pm 0,16$	0,35 $\pm 0,16$
Monomères / V = 0,8 V	0,80 $\pm 0,23$	1,02 $\pm 0,09$
Monomères / V = 3 V	0,93 $\pm 0,28$	1,1 $\pm 0,07$

Tableau C.2 : Energies d'activation en eV calculées pour les films de fibres et de monomères HET à partir des dépendances de la **Figure C.8**.

Les E_a calculées dans le cas des monomères sont largement supérieures à 400 meV ce qui est conforme à la diffusion d'ions²⁹. Les énergies d'activation des films de fibres sont plus basses. Cependant, ces dépendances ne permettent pas réellement de discriminer les processus de transport de protons par diffusion ou via le mécanisme de Grotthuss. En effet, les énergies d'activation estimées sont parfois inférieures à 400 meV, notamment dans le deuxième régime de conduction, ce qui laisse penser que le mécanisme de Grotthuss est possible. Or, la plupart des matériaux supportant une conduction de type Grotthuss ont des E_a encore plus faibles (autour de 200-250 meV)⁴⁰. Cependant, il faut considérer que plusieurs mécanismes de conduction se produisent au sein des échantillons de fibres, notamment au moins un mécanisme de transport intra-fibres et un mécanisme inter-fibres. En effet la longueur des fibres HET (entre 10 et 100 μm) est très inférieure au gap inter-électrodes (1 mm). Un mécanisme de transport de charges entre les fibres est donc nécessaire. Cela peut expliquer ces valeurs d' E_a plus élevées.

I.3. Production électrochimique de protons

La présence d'un régime $I-V$ respectant une loi de puissance avec une pente $a > 1$ (représentation doublement logarithmique) indique que le nombre de porteurs de charge augmente au sein du matériau ; autrement dit, que des charges sont injectées. Etant donné qu'il est impossible d'injecter des protons via des électrodes de carbone comme celles de notre dispositif, "l'injection" de protons dans notre système se fait vraisemblablement via une réaction électrochimique. Comme mentionné plus haut, l'électrolyse de l'eau est possible dans la gamme de tensions étudiée.

Les réactions supposées avoir lieu aux électrodes sont présentées **Figure C.9 (a)**. Les protons issus de l'électrolyse de l'eau à l'anode ($E_a^0 > 1,23 \text{ V}$) sont transportés à travers l'électrolyte jusqu'à la cathode où ils peuvent-être recombinaés avec le dioxygène atmosphérique pour former du peroxyde d'hydrogène¹⁶³ ($E_c^0 = 0,68 \text{ V}$). D'un autre côté, les électrons circulent dans le circuit électrique polarisant les électrodes. La DDP nécessaire pour que ce phénomène ait lieu est au minimum de $E_a^0 - E_c^0 = 0,55 \text{ V}$, ce qui est en accord avec nos résultats.

Le dioxygène entrant en jeu dans la réaction cathodique, le passage de ce système dans une atmosphère privée d'oxygène devrait avoir un effet important sur sa réponse électrochimique.

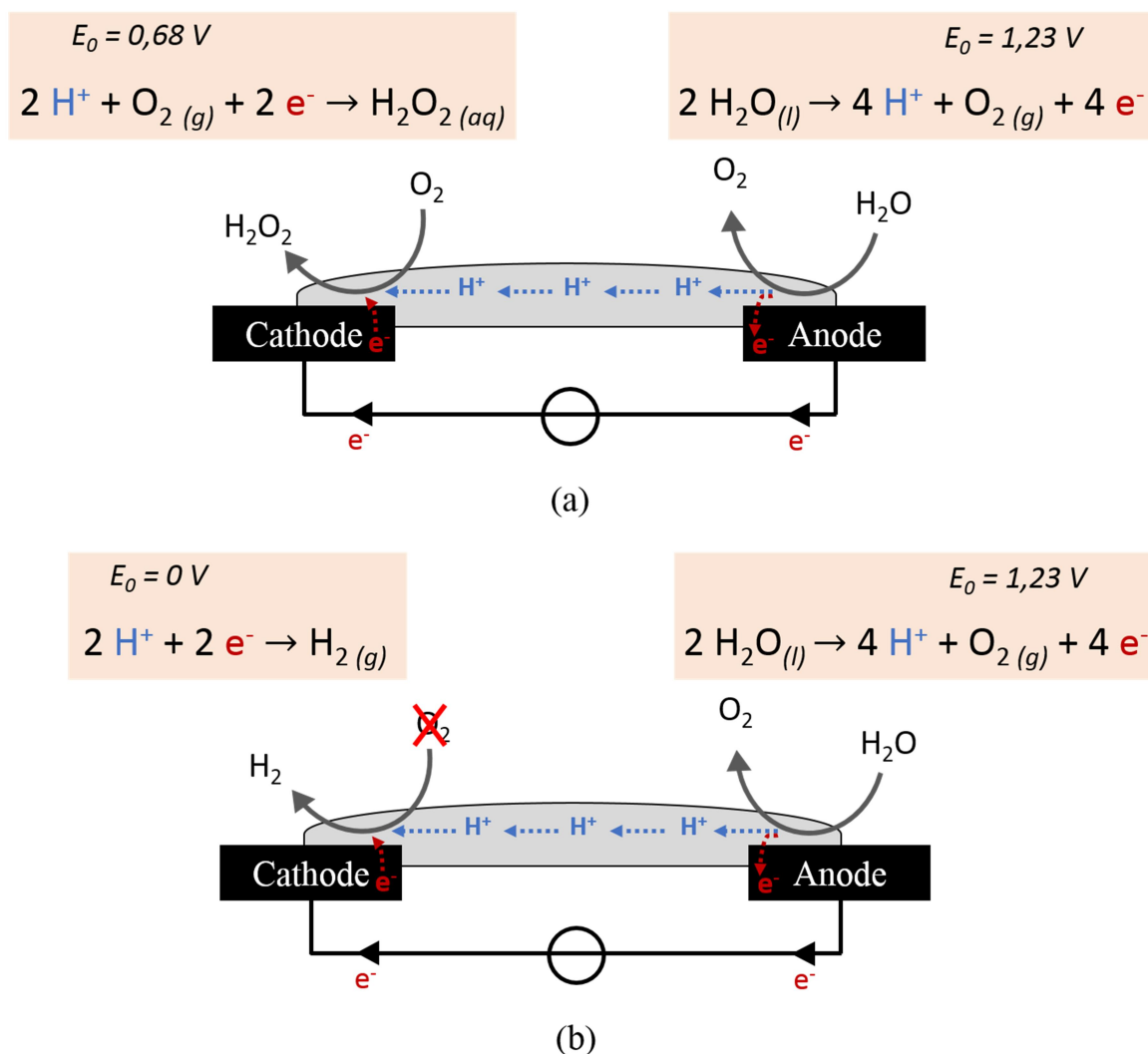


Figure C.9: réactions supposées aux électrodes (a) en présence d'oxygène et (b) en absence d'oxygène.

I.3.1. Effet de l'oxygène sur la conduction : I-V

Les caractéristiques *I-V* ont cette fois-ci été mesurées dans une atmosphère privée d'oxygène. Pour cela, le sac à gants dans lequel sont placés les échantillons est rempli d'argon ou bien d'azote (les résultats sont identiques dans les deux cas). Le taux d'oxygène présent dans le sac

est contrôlé grâce à un indicateur d'oxygène (GMH 3692 GOG-H- GHM Greisinger). L'expérience présentée ici a été reproduite au moins cinq fois et les résultats sont toujours reproductibles. Tous les échantillons ont été testés de la même manière : une première mesure I - V est réalisée dans l'air, puis on procède à l'échange gazeux de l'atmosphère pour parvenir à un taux d'oxygène stable inférieur à 0,1%. Après équilibration, une caractéristique I - V est de nouveau acquise. Enfin, les conditions atmosphériques "ordinaires" de l'air sont rétablies et une dernière mesure I - V est faite. L'échantillon est toujours laissé à équilibrer au moins une heure à taux d'oxygène stable. L'humidité relative à l'intérieur du sac est maintenue constante à 70%.

La caractéristique I - V du film composé de fibres HET obtenu en absence d'oxygène est analogue à la caractéristique classique réalisée dans l'air mais avec un décalage vers les plus hauts potentiels (**Figure C.10**). En effet, la caractéristique comporte toujours les différents régimes de conduction marqués par une première pente de 1 et une seconde pente comprise entre 2 et 3. Toutefois, le potentiel auquel se produit la transition entre les deux régimes est plus élevé. Celle-ci survient à presque 2 V, soit environ 1 V de plus par rapport à la courbe obtenue dans l'air. De plus, cet effet est complètement réversible puisque après rééquilibration dans les conditions atmosphériques, la caractéristique I - V initiale est retrouvée. A contrario, aucun effet significatif n'est observé sur la caractéristique des monomères (**Figure C.10 encart**).

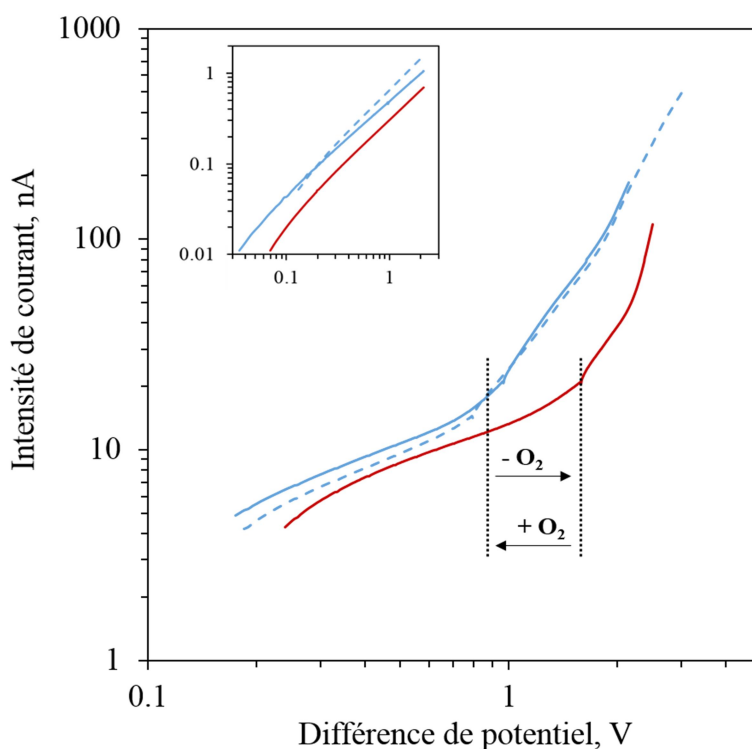


Figure C.10 : caractéristiques I - V d'un film de fibres amyloïde HET et d'un film de monomères HET (encart) en présence ou absence d'oxygène. En bleu, les caractéristiques obtenues en présence d'oxygène (atmosphère air, $O_2 = 21\%$), en rouge, en absence d'oxygène ($O_2 < 0,1\%$) et en bleu pointillé de nouveau en présence d'oxygène, après les conditions anoxiques.

Cet effet de l'oxygène sur la caractéristique $I-V$ des fibres est en accord avec l'idée selon laquelle l'hydrolyse de l'eau se produit. En effet, en conditions d'anoxie, la réaction anodique produisant le peroxyde d'hydrogène est impossible. La réaction qui pourrait alors siéger à la cathode pourrait être la recombinaison des protons avec les électrons produisant du dihydrogène (**Figure C.9 (b)**). Le potentiel standard de cette réaction est de 0 V. Ces réactions pourraient donc se produire qu'à partir d'une DDP au minimum de 1,23 V. Cela peut expliquer le décalage réversible de la DDP marquant le début du régime exponentiel entre les caractéristiques $I-V$ des fibres en présence et en absence d'oxygène (décalage de *ca.* 1 V).

Notons que les potentiels standards évoqués depuis le début sont ceux obtenus avec une électrode standard à hydrogène et ne tiennent pas compte de la surtension des électrodes de carbone vitreux. De plus, les valeurs de potentiel enregistrées avec notre appareil de mesure ne sont pas extrêmement rigoureux puisque effectuées sans électrode de référence.

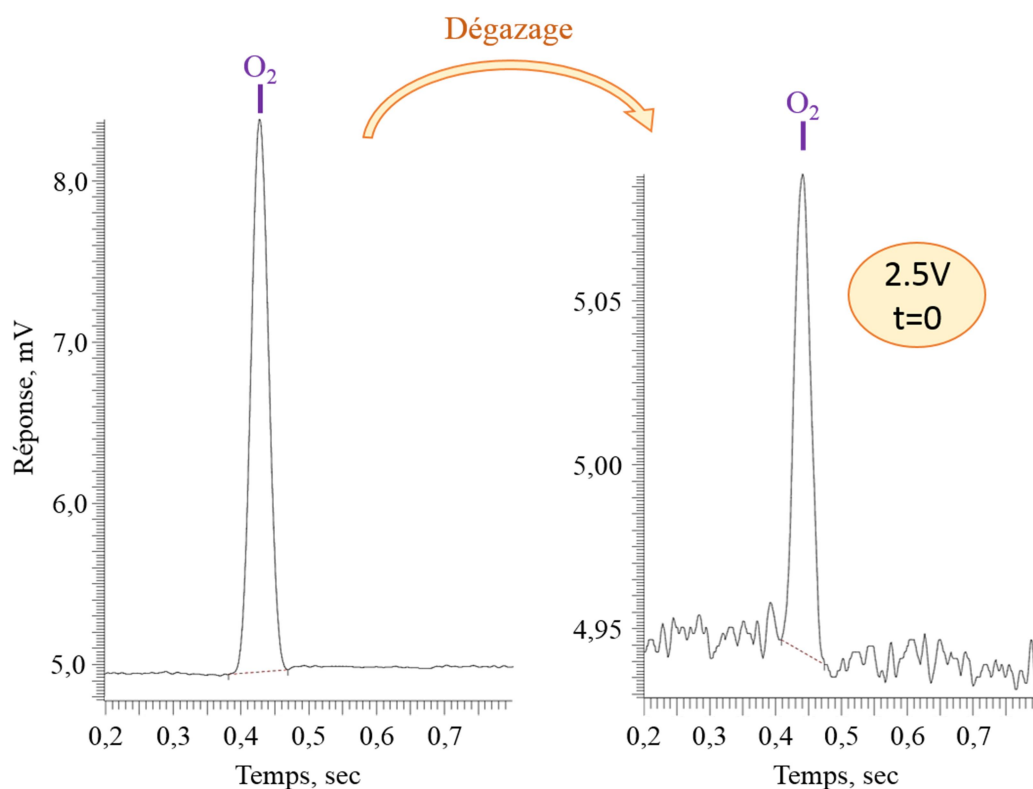
De plus, nous sommes conscients que ce schéma réactionnel présenté est peut-être simpliste, notamment concernant les réactions proposées en présence d'oxygène. En effet, cette espèce très réactive peut donner lieu à de nombreuses réactions c'est pourquoi il est probable que les mécanismes de réactions soient en réalité plus complexes. Enfin, le H_2O_2 supposément produit est un composé délétère pour les matériaux biologiques. Cela explique le fait que les mesures électriques en absence d'oxygène sont souvent plus stables, notamment à hautes DDP (données non montrées).

1.3.2. Production d'hydrogène

Dans le but de vérifier si du dihydrogène est produit lors du passage d'un courant à travers un film de fibres HET en absence d'oxygène, une expérience préliminaire utilisant la technique de chromatographie en phase gazeuse (GC : Gas Chromatography, en anglais) a été réalisée. Cette technique consiste à séparer les différentes molécules d'un mélange gazeux grâce aux différentes affinités de ces dernières avec une substance active. Le mélange à analyser est injecté dans une colonne contenant la substance active à travers qu'il est amené à traverser. Les molécules ressortent séparées de la colonne avec un décalage temporel qui est fonction de leur affinité avec la substance active. Un pic d' O_2 est attendu en sortie de colonne après c.a. 0,45 seconde alors que la présence d' H_2 sera détectée au bout de 0,35 seconde.

Un film de protéine est préparé entre deux électrodes de carbone vitreux sur le dispositif habituel. Le dispositif est ensuite placé dans un ballon en verre de volume réduit hermétiquement fermé par un septum. Un dégazage avec du diazote est réalisé pendant 1h dans le but d'éliminer le dioxygène. Le flux de N_2 passe préalablement dans un barboteur contenant de l'eau afin d'instaurer une humidité assez élevée au sein du ballon qui permette en particulier la conduction de proton à travers le film de fibres HET. L'expérience est réalisée pour un film de fibres HET puis pour un film de monomères. On vérifie alors pour chacun des échantillons que la caractéristique $I-V$ typique des fibres ou des monomères respectivement est bien respectée (donnée non montrée). Un échantillon de l'atmosphère du

ballon est prélevé grâce à une seringue puis injecté dans le chromatographe en phase gazeuse (Clarus 580, PerkinElmer) pour analyse, avant et après dégazage. Celle-ci montre que la quasi-totalité d'O₂ a été éliminée lors de cette étape. Seul un pic proche de la ligne de base témoigne de la présence d'O₂ résiduel après dégazage (**Figure C.11, haut**). Ceci est identique pour les deux expériences (fibres et monomères).



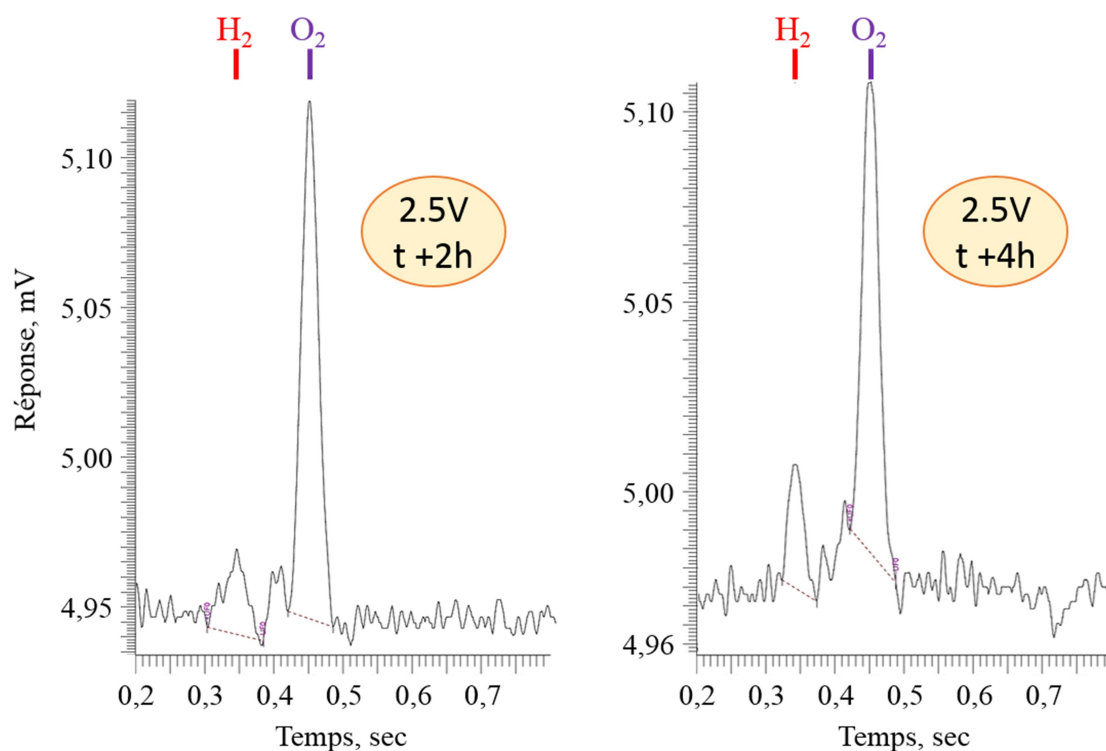


Figure C.11 : Analyses de chromatographie en phase gazeuse montrant l'étape de dégazage (haut) puis l'apparition de di-hydrogène au cours de la polarisation continue d'un film de fibres HET à 2,5V.

Une DDP de 2,5V est alors imposée aux bornes du film de protéines. L'intensité de courant traversant les échantillons de fibres (courant stable après la phase de décroissance habituelle Cf. **Figure C.5**) est alors de *c.a.* 100nA et de *c.a.* 1,2μA dans le cas des monomères (données non montrées). Un échantillon du gaz contenu dans le ballon est prélevé et analysé par GC après différentes durées alors que la DDP est maintenue constante et que l'intensité de courant reste stable. Dans le cas des fibres HET, un pic très faible correspondant à la présence d'H₂ semble se détacher de la ligne de base après 2h. Après 4h, ce pic est beaucoup plus visible. Celui-ci se dégage plus clairement du bruit de fond même s'il reste faible (**Figure C.11**). Avec le film de monomères, on ne détecte pas d'H₂ après 3h (**Figure C.12**).

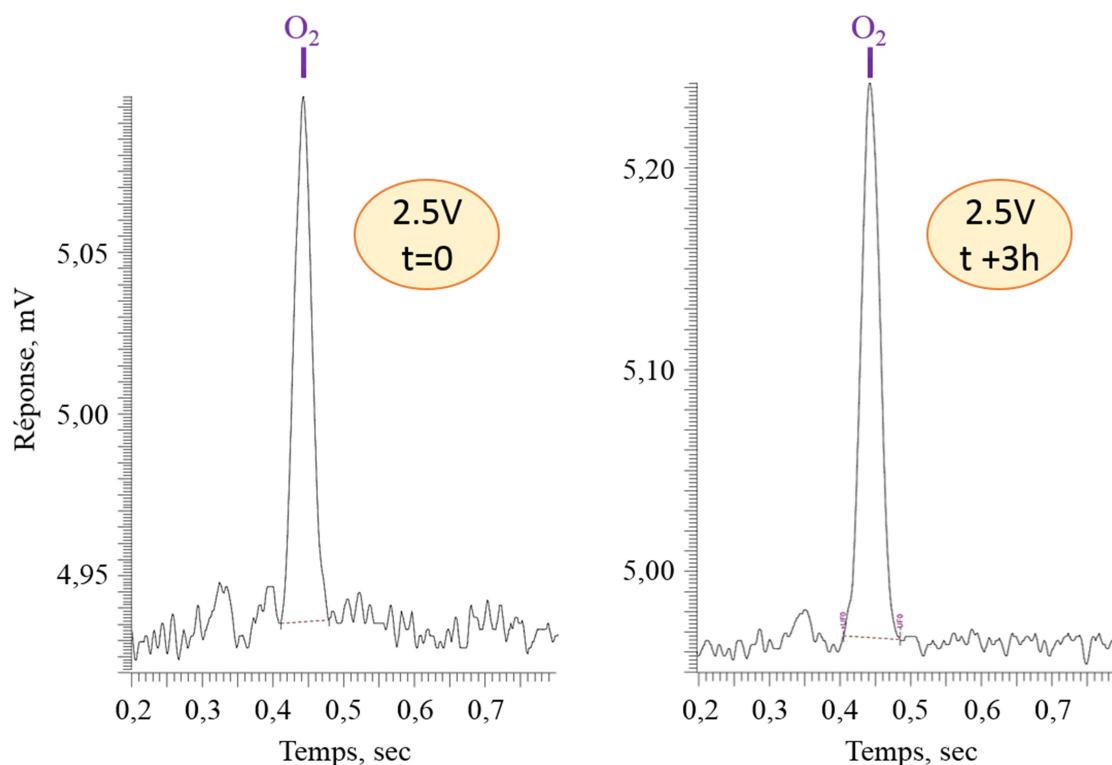


Figure C.12 : Analyses de chromatographie en phase gazeuse au cours de la polarisation continue d'un film de monomères HET à 2,5V. Aucun autre gaz que l'O₂ résiduel après l'étape de dégazage (**Figure C.11, haut**) n'est détecté.

Ces résultats montrent qu'une réaction produisant du H₂ gazeux a lieu lorsqu'un courant continu traverse un film (hydraté) de protéine HET uniquement si celle-ci est arrangée sous la forme de fibres amyloïdes. Cette expérience appuie l'idée précédemment avancée proposant que des réactions électrochimiques se produisent aux électrodes. De plus, les réactions proposées en absence d'oxygène s'avèrent possibles. A la manière d'un électrolyte solide, les fibres HET semblent donc bien autoriser un processus de transfert de protons efficace permettant la mise en place d'un tel système électrochimique.

Ce résultat reste à confirmer pour d'autres échantillons. De plus, une étude plus optimisée (ex : améliorer les niveaux de courant traversant le film espérant augmenter la quantité de gaz produite) et plus poussée (quantification des espèces produites...) est également nécessaire.

1.3.3. Catalyse de la dissociation de l'eau ?

Une expérience contrôle consiste à réaliser une dépendance $I-V$ pour une goutte (40 μ L) d'HCl 100 μ M (la solution utilisée pour la formation des fibres HET). Le même dispositif : électrodes de carbone vitreux séparées de 1 mm est utilisé. L'expérience est réalisée avec le même instrument de mesure utilisé pour la caractérisation électrique des films HET (Keithley 4200). Ceci est effectué en présence et en absence d'oxygène de la même façon que décrit au paragraphe précédent **I.3.1**.

Lors de l'étude de systèmes électrochimiques, les potentiostats permettent habituellement de mesurer et de prendre en compte la "chute ohmique" caractéristique du système étudié. Cette

composante correspond à une résistance ohmique dépendant de la nature de l'électrolyte, du matériau et de la distance des électrodes etc... . Ainsi, la DDP réelle U à appliquer pour permettre la réaction électrochimique faisant intervenir un couple redox de potentiel d'oxydoréduction E^0 est, de façon simplifiée :

$$U = E^0 + RI$$

Avec RI la "surtension" à ajouter pour compenser la chute ohmique.

Les courbes sont habituellement automatiquement corrigées de manière à "annuler" cette composante. Le potentiel affiché par l'appareil de mesure correspond ainsi au potentiel caractéristique du couple redox étudié. Dans notre cas, l'appareil de mesure ne permet pas cela c'est pourquoi une correction (théorique) de la chute ohmique correspondante à notre système est calculée à posteriori. Les courbes I - V mesurées (**Figure C.13 (c)**) et corrigées avec la chute ohmique (**Figure C.13 (d)**) sont comparées à celles des fibres HET (**Figure C.13 (a)**), également corrigées de la même manière (**Figure C.13 (b)**). L'idéal serait de répéter ces mesures avec un potentiostat pouvant directement mesurer et corriger cette chute ohmique.

Enfin, il faut préciser que nous n'avons pas utilisé d'électrode de référence. En effet, les films de protéines constituent des électrolytes solides dans lesquels il est impossible d'introduire une électrode de façon simple. Dans le but de conserver strictement la même configuration de mesure, ce système à seulement deux électrodes est également employé pour les mesures sur la goutte d'HCl.

Pour ces raisons, les valeurs de potentiel relevées sont donc à nuancer.

En présence d'oxygène, un courant exponentiel est observé avec la goutte d'HCl à partir d'une DDP d'environ 1,2 V. En absence d'oxygène, cette DDP est décalée à environ 3,0 V (**Figure C.13 (d)**). Comme pour les fibres HET (cf. le paragraphe précédent **I.3.1**), cet effet est réversible (données non montrées). De plus, une composante supplémentaire semble présente sur la caractéristique I - V réalisé en présence d'oxygène. En effet, deux ruptures de pentes sont visibles (à *ca.* 1,2 et 3,0 V) contre une seule (à *ca.* 3.0 V) en absence d'oxygène. De façon similaire, la caractéristique I - V correspondant aux fibres HET en présence d'oxygène semble présenter 2 ruptures de pente à *ca.* 0,9 V et 1,5 V et une seule en absence d'oxygène : vers *ca.* 2,5 V (**Figure C.13 (b)**).

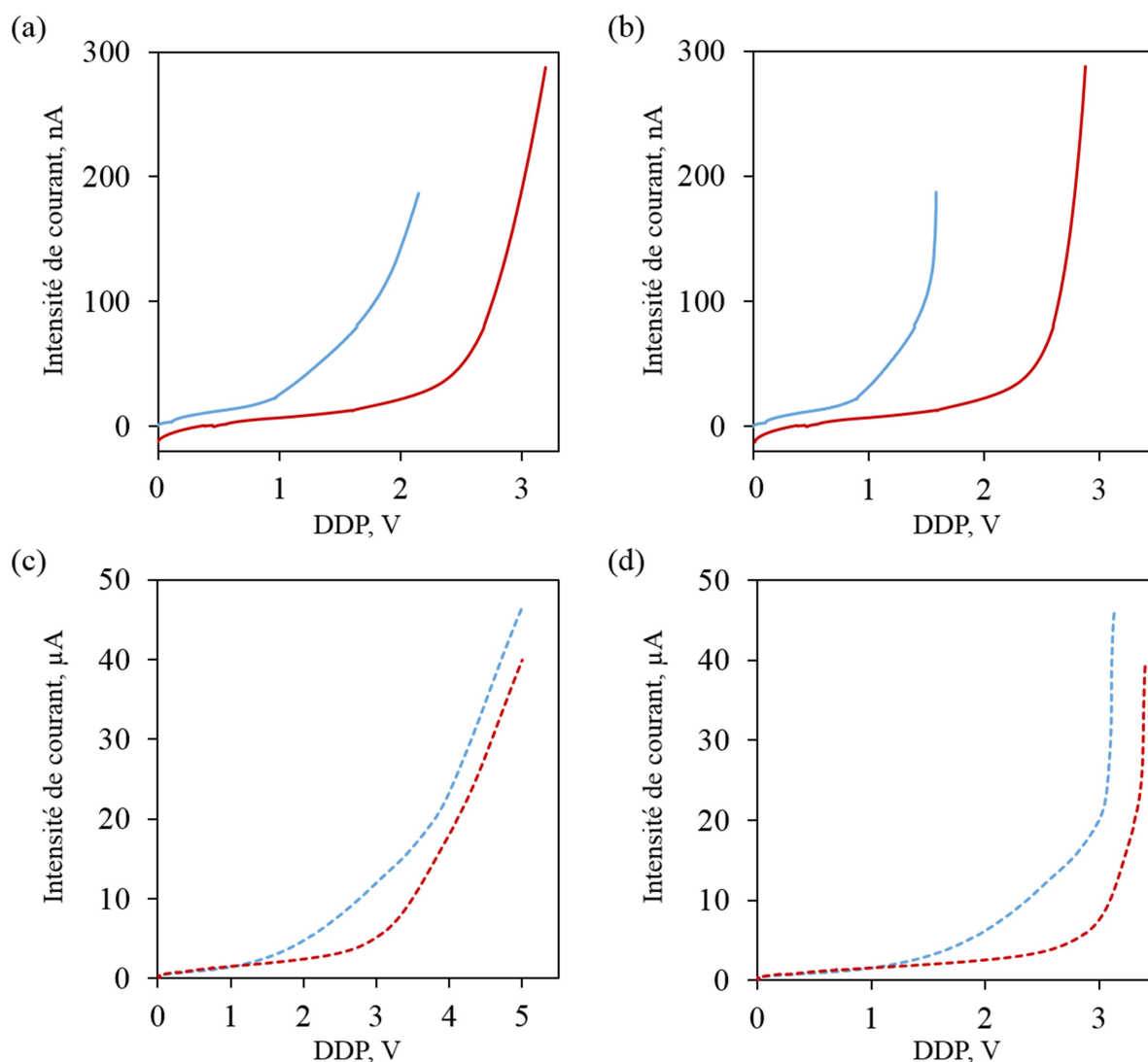


Figure C.13 : Caractéristiques $I-V$ (a) et caractéristiques avec une correction de chute ohmique (b) d'un film "sec" de fibres HET en présence et en absence d'oxygène (respectivement courbes bleues et rouges). La même expérience $I-V$ est réalisée pour une goutte (restée liquide) d'HCl 100μM (c) et également représentée avec une correction de chute ohmique (d).

Dans le cas du courant observé avec la goutte d'HCl à partir de *ca.* 1,2 V, il n'y a aucun doute quant au fait que celui-ci résultant de la réaction d'électrolyse de l'eau à l'anode. Il est possible de considérer notre système {film de protéines + électrodes} comme une cellule électrochimique, le film de protéine jouant alors le rôle d'électrolyte solide. Ainsi, de la même manière que ce qu'il se passe avec la goutte de solution d'HCl, le courant observé peut correspondre à un courant d'oxydoréduction issu de l'hydrolyse de l'eau. Or, dans ce cas, la phase exponentielle due à cette réaction semble débiter à plus basse DDP qu'avec la goutte d'HCl (environ 0,9 V contre 1,2 V respectivement), notamment en absence d'oxygène (2,5 V contre 3 V). Cela peut-être expliqué par le fait que cette réaction est catalysée en présence des fibres ou bien que d'autres réactions ont lieu (réaction(s) avec des groupes ionisables de la protéine ?).

Enfin, comme mentionné plus haut, il est probable que les réactions proposées soit en réalité plus complexes. Cela expliquerait la présence d'une composante supplémentaire observée sur les courbes I - V obtenues en présence d'oxygène.

I.4. Conclusion

Pour conclure, les films de protéine HET sont capables de supporter une conductivité électrique similaire à celle des matériaux semi-conducteurs à grand gap. De la même manière que la plupart des matériaux biologiques, la conductivité de nos échantillons est extrêmement sensible à l'humidité environnante. Nous avons identifié des mécanismes de conduction différents suivant l'organisation supramoléculaire de cette protéine : monomères (structure désorganisée) ou fibres amyloïdes (structure ordonnée). La conductivité des échantillons de monomères est due à de la diffusion ionique. Seule la structure des fibres amyloïdes HET permet de supporter un mécanisme de conduction protonique très efficace sur de longues distances. Cela conduit à une meilleure conductivité des échantillons de fibre ainsi qu'à une caractéristique I - V différente présentant deux régimes au lieu d'une caractéristique de type ohmique. Nous proposons que le processus de transfert de charges alors incriminé soit du même type que le mécanisme de Grotthuss et que les protons circulant dans ce système proviennent de l'hydrolyse de l'eau se produisant à l'anode à partir d'une tension seuil. Cette réaction est responsable de la non linéarité de la caractéristique I - V de l'échantillon.

En outre, on suppose que les fibres favorisent l'organisation des molécules d'eau en réseau stabilisé par liaisons-H, condition nécessaire au mécanisme de Grotthuss, contrairement au cas où les protéines ne sont pas organisées (monomères). La conductivité des films de fibres est ainsi extrêmement sensible à l'humidité autant parce que l'eau, via la réaction d'hydrolyse, serait la source des protons circulant au sein du film, que parce que les molécules d'eau présentes dans le film (eau adsorbée et eau de structure des fibres) constituent les éléments conducteurs du mécanisme de transport supposé (mécanisme type Grotthuss). Une HR au minimum comprise entre 40 et 50 % est notamment nécessaire pour observer le comportement I - V à deux régimes caractéristique des fibres HET. On propose de définir cette HR de *c.a.* 40-50% comme le seuil de percolation.

Au-dessus de la tension de seuil, l'électrolyse de l'eau se produisant à l'anode, une autre réaction se produit nécessairement à la cathode. En présence d'oxygène atmosphérique, cette seconde réaction peut être la réduction du dioxygène produisant de l'eau oxygénée en consommant des protons et des électrons. La tension seuil nécessaire à ce système est supérieure à 0,5 V. En absence de dioxygène dans l'atmosphère, la réaction cathodique peut alors consister en la recombinaison des protons et avec les électrons arrivant à l'électrode pour former du dihydrogène. D'ailleurs, dans ce dernier cas, la production de ce gaz a été mise en évidence par des expériences préliminaires qui devront être confirmées. La DDP seuil nécessaire est alors plus grande qu'en présence d'oxygène et est au minimum de 1,23 V ce qui

concorde avec nos observations. Lorsque la protéine est désorganisée (*i.e.* sous forme de monomères), l'absence de mécanisme de conduction de protons efficace fait que ces phénomènes électrochimiques ne peuvent pas se produire aux DDP étudiées.

Par ailleurs, il semble qu'en présence des fibres HET, l'électrolyse de l'eau soit facilitée et se produise à une DDP légèrement plus faible que dans le cas d'une goutte de solution HCl 100 μ M, solution utilisée comme solvant des fibres. Cependant, il faudrait idéalement reproduire les mesures $I-V$ avec un appareil pouvant prendre en compte la chute ohmique réelle du système ainsi qu'avec une électrode de référence pour des mesures plus fidèles.

II- Etude de l'interaction eau-fibres HET

La présence d'eau au sein des films de fibres HET impacte les mécanismes de conduction. Par conséquent, il est important d'étudier les interactions entre l'eau et les fibres HET ainsi que l'effet de l'hydratation sur la structure de ces dernières. L'interaction entre les molécules d'eau et les fibres a été étudiée au moyen de simulations numériques de dynamique moléculaire, réalisées par le Dr. Serge Crouzy (UMR5249-LCBM), ainsi qu'avec la mesure de l'adsorption/désorption de l'eau par un échantillon de fibres HET. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec le professeur Laurent Gonon (UMR5819-SyMMES). Enfin, après une première caractérisation de la structure des fibres HET par Diffusion des rayons X aux petits angles sur la ligne ID13 de l'ESRF avec le Dr. Thomas G. Dane, l'effet de l'hydratation sur la structure des fibres HET a été étudié par diffusion des neutrons sur les instruments D16 et D19 de l'ILL avec le Dr. Bruno Demé, le professeur Trevor Forsyth et le Dr. Estelle Mossou (ILL).

II.1. Etude de l'interaction eau-fibre : simulation de dynamique moléculaire

Une fibre amyloïde composée de 12 sous-unités HET a été modélisée à partir de la structure des fibres amyloïdes HET-s(218-289) déterminée par RMN du solide et disponible sur la PDB (Protein Data Bank). Cette fibre a virtuellement été mise en présence d'eau : l'état d'équilibre du système a été calculé pour une durée d'environ 30ns. Les conditions hygrométriques de la simulation correspondent à une HR élevée (> 80%). Le résultat de la simulation est résumé par la **Figure C.14 (a)** représentant la fibre HET entourée de molécules d'eau symbolisées par des sphères.

Les calculs ont été réalisés à l'aide du programme de simulation et d'analyse de mécanique moléculaire CHARMM en considérant chaque atome et molécule comme un champ de force polarisable. L'écart quadratique moyen de chaque molécule d'eau par rapport à sa position d'origine (rmsd pour root mean square deviation en anglais) est calculé pour toute la durée de la simulation. Deux populations de molécules d'eau peuvent-être différenciées (**Figure C.14 (b)**). La majeure partie (plus de 1000 molécules) possède un rmsd élevé ($\text{rmsd} > 28\text{\AA}$) correspondant au mouvement des molécules dû à l'agitation thermique. En revanche, environ 550 molécules d'eau sont plus stables ($\text{rmsd} < 28\text{\AA}$) et parmi ces dernières, 250 bougent très peu. Elles possèdent un rmsd très faible, inférieur à $10\text{\AA}$. Ces dernières sont représentées en

bleu sur la **Figure C.14 (a)** où deux canaux de molécules d'eau quasiment fixes sont distinguables le long de la fibre HET. Ces molécules d'eau sont stabilisées à proximité de résidus polaires ou chargés avec lesquels des liaisons-H peuvent s'établir.

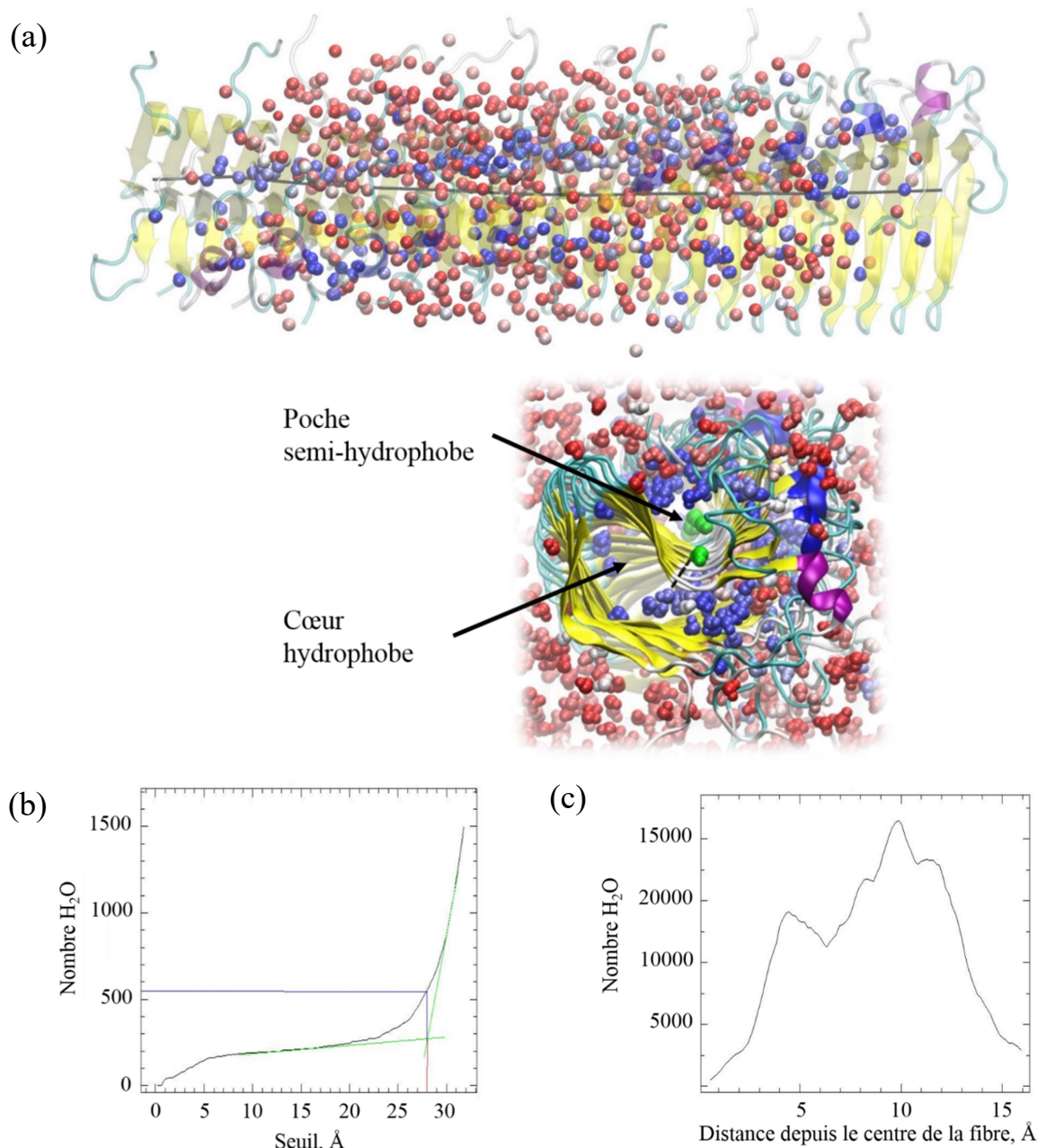


Figure C.14 : Simulation de dynamique moléculaire représentant une fibre HET de 12 sous-unités en présence d'eau. (a) Vues latérales et transversales de la structure moyenne du système sur les 7,3 dernière ns de simulation. Les brins- β de la fibre apparaissent en jaune. Son axe central est représenté par une ligne noire. Les molécules d'eau sont représentées par des sphères avec une échelle de couleur allant du rouge pour celles ayant un rmsd (root mean square deviation) élevé au bleu pour les plus stables. Sur la vue transversale, les molécules d'eau colorées en vert sont extrêmement stables (rmsd de 1-2 Å) (b) Recensement du nombre de molécules d'eau possédant un rmsd inférieur au seuil indiqué en abscisse. (c) Nombre de molécules d'eau stables au cours de la simulation (rmsd < 8 Å) en fonction de l'éloignement du centre de la fibre.

L'histogramme représentant la répartition du nombre de molécules d'eau ayant un rmsd $< 8\text{\AA}$ par rapport à l'axe de la fibre (**Figure C.14(c)**) montre que le premier canal est situé à une distance d'environ $4,5\text{ \AA}$ de cet axe. Celui-ci est vraisemblablement stabilisé par des asparagines (N226, N243, N262 et N279) situées au niveau de l'entrée du cœur hydrophobe. Le second, qui semble un peu moins stable, est constitué de molécules situées dans la poche semi-hydrophobe entre $8,3$ et $11,2\text{ \AA}$ du centre de la fibre. Ce canal est plutôt stabilisé par des résidus chargés identifiés à proximité (notamment R238, R255, E258, E280, D288). On remarque également la proximité de ces réseaux d'eau avec les résidus aromatiques de la protéine : Y281 proche du premier réseau et F286 et W287 du second.

Ce résultat de simulation montre que l'organisation de la protéine en fibres amyloïdes rend possible la stabilisation de deux réseaux de molécules d'eau le long de celles-ci grâce à l'établissement des liaisons-H avec des résidus particuliers. De plus, ces deux canaux d'eau sont situés dans ce que l'on pourrait qualifier de "rainures" : dans la poche semi-hydrophobe et à l'entrée du cœur hydrophobe. Celles-ci résultent de la géométrie des fibres parallèlement à leur axe d'élongation et sont de dimensions très réduites (largement inférieures à 6 nm , le diamètre d'une fibre). Ceci est particulièrement bien visible sur la vue transversale de la fibre présentée **Figure C.14 (a)**. Or, il a été montré que le confinement d'eau dans des pores de dimensions nanométriques renforçait la force des liaisons-H entre molécules voisines¹⁶⁴. Ceci peut expliquer la grande stabilité de ces réseaux, en plus de la présence des résidus polaires. Cette simulation suggère donc que deux réseaux étendus et continus de liaisons-H peuvent se former le long des fibres dès lors que la densité en molécules d'eau adsorbée dans ces canaux est suffisante. Ces réseaux représentent typiquement une configuration autorisant le transport de protons par un mécanisme de type Grotthuss^{34,165}.

Par ailleurs, il est possible que ces deux canaux d'eau très stables participent au maintien de la structure des fibres HET. En effet, nombreuses études de dynamique moléculaire, mais aussi d'analyse de structure des fibres amyloïde par diverses méthodes expérimentales (en particulier diffraction des RX, des électrons ou des neutrons) montrent que l'eau joue un rôle primordial dans les mécanismes d'agrégation, dans la stabilisation de leur structure ainsi que dans leur polymorphisme. Cela semble être fait commun aux fibres amyloïdes^{166,167}. Il a notamment été avancé que les fibres amyloïdes peuvent être considérées comme des nanotubes remplis d'eau. L'eau localisée dans les cavités des fibres participe à la stabilité de la structure en formant des réseaux de liaisons-H avec les chaînes latérales polaires des feuillettes- β ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Il serait intéressant de mener des études plus approfondies sur cet aspect de l'agrégation et de la structure des fibres HET.

Un autre résultat intéressant ressortant de cette simulation est que l'existence d'un système π -délocalisé étendu via les résidus aromatiques en interactions de type van der Waals (empilement π - π : π - π stacking) semble impossible le long des fibres HET. En effet, ces deux acides aminés sont situés sur une boucle flexible dont la position est très fluctuante sur la durée de la simulation (données non montrées). Ainsi, la possibilité de transfert d'électrons par délocalisation et/ou sauts entre aromatiques semble compromise.

L'existence de ces deux canaux n'a pas été prouvée directement d'un point de vue expérimental, cependant les études suivantes montrent une forte interaction entre l'eau et les fibres HET.

II.2. Etude expérimentale de l'interaction eau-fibre

II.2.1. Isotherme d'adsorption d'eau des fibres HET

Les isothermes d'adsorption et désorption de l'eau des fibres HET ont été obtenus grâce à un analyseur gravimétrique de sorption (SGA-100, VTI instruments) avec un échantillon de fibres HET où l'eau a préalablement été éliminée par lyophilisation. Celui-ci est disposé sur la balance du SGA placée dans la chambre confinée de l'appareil dont l'atmosphère est régulée très précisément. L'atmosphère est d'abord complètement séchée ($HR < 1\%$), la masse de l'échantillon est alors de 12,16 mg. Le taux d'hydratation est ensuite augmenté jusqu'à une $HR = 95\%$, puis diminué (par paliers de 5%) jusqu'à une $HR = 5\%$. La variation de masse de l'échantillon due à l'adsorption/désorption d'eau est mesurée en continu. L'instrument est programmé pour attendre que la masse de l'échantillon soit stabilisée (variation de masse $< 0,005\%$ en 10 minutes) avant de passer au niveau d'hydratation suivant. Le nombre de sous-unités HET contenues dans l'échantillon est estimé à $8,4 \cdot 10^{17}$ à partir de sa masse pesée en condition déshydratée. Le nombre de molécules d'eau (masse $H_2O = 2,93 \cdot 10^{-20}$ mg) adsorbées par sous-unité HET est déduit pour chaque palier.

Les isothermes d'adsorption et de désorption d'eau des fibres HET sont quasiment superposables et sont conformes à la forme générale des isothermes de sorption : une sigmoïde présentant trois phases (**Figure C.15**).

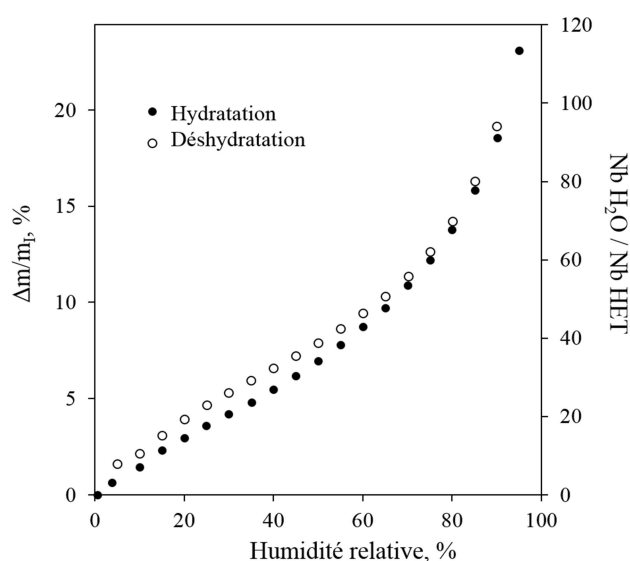


Figure C.15 : Isothermes d'adsorption et de désorption d'eau des fibres HET.

La première phase, ici difficile à distinguer de la seconde, peut-être discernée entre 0 et 15-20 % d'HR. Celle-ci se rapporte à la formation d'une monocouche d'eau sur la surface du matériau accessible à l'eau. Puis entre 20 et environ 60% d'humidité, l'adsorption d'eau par l'échantillon est linéaire relativement aux variations d'HR. Cette seconde phase témoigne de l'adsorption progressive d'eau sur la monocouche initiale. Enfin une phase exponentielle est atteinte pour les humidités plus élevées ($HR > 60\%$). L'eau adsorbée lors de cette dernière phase correspond à l'eau considérée comme liquide dans les interstices du matériau.

En comparant la forme des isothermes de sorption/désorption de l'eau par les fibres (**Figure C.15**) avec celle de l'histogramme dénombrant les molécules d'eau en fonction de leur stabilité à la périphérie d'une fibre (rmsd calculé lors de la simulation, **Figure C.14 (b)**), on s'aperçoit que celles-ci sont similaires. Cet histogramme indique notamment qu'environ 550 molécules d'eau, soit 46 molécules/sous-unité HET, peuvent être considérées comme stables et environ 250, soit 21 molécules/sous-unité HET comme très stables. Ces molécules peuvent être considérées comme faisant parti de la couche d'hydratation périphérique des fibres. En effet, l'eau constituant la couche d'hydratation d'un matériau (phases 1 et 2 d'un isotherme de sorption) est caractérisée par une plus grande stabilité en raison des interactions avec ce dernier et ne possède pas les mêmes propriétés que l'eau liquide (phase 3 d'un isotherme). Dans notre système, ces molécules d'eau sont en particulier localisées dans les deux canaux d'eau.

Ceci est en accord avec l'isotherme de sorption des fibres. En effet, celui-ci montre qu'entre 20 et 25 molécules d'eau/sous-unité HET sont adsorbées par l'échantillon lors de la première phase et environ 50 molécules d'eau/sous-unité HET sont adsorbées à la fin de la deuxième phase. Ces deux phases correspondant à la constitution d'une monocouche d'hydratation des fibres et à l'extension de celle-ci, nous pouvons donc considérer que l'eau adsorbée entre 0 et environ 70 % d'HR interagit fortement avec les fibres. Cette eau contribue en particulier à la formation et au remplissage des canaux d'eau. Au-delà de 70 % d'HR, l'eau supplémentaire adsorbée se rapporte en grande majorité à de l'eau libre autour des fibres.

II.2.2. diffusion des RX et des neutrons

II.2.2. i) Diffusion des rayons X aux petits et grands angles: principales caractéristiques structurales des fibres HET

Une expérience préliminaire de diffusion des RX au grands et petits angles (WAXS/SAXS : Wide-Angle /Small-Angle X-ray Scattering), réalisée par les Dr. Thomas Dane et Dr. Patrice Rannou sur la ligne ID13 à l'ESRF, a permis la caractérisation des échantillons de fibres HET sous la forme de fagots (Cf. **Matériel et Méthode III.2.2.**) comme ceux utilisés pour la diffusion des neutrons (**Figure C.17**). Ces échantillons sont obtenus en séchant une goutte d'échantillon de fibres étirées entre deux pointes. Le cliché de diffusion obtenu exhibe certaines des grandeurs caractéristiques de la structure des fibres amyloïdes, en accord avec la littérature¹¹² (**Figure C.16**).

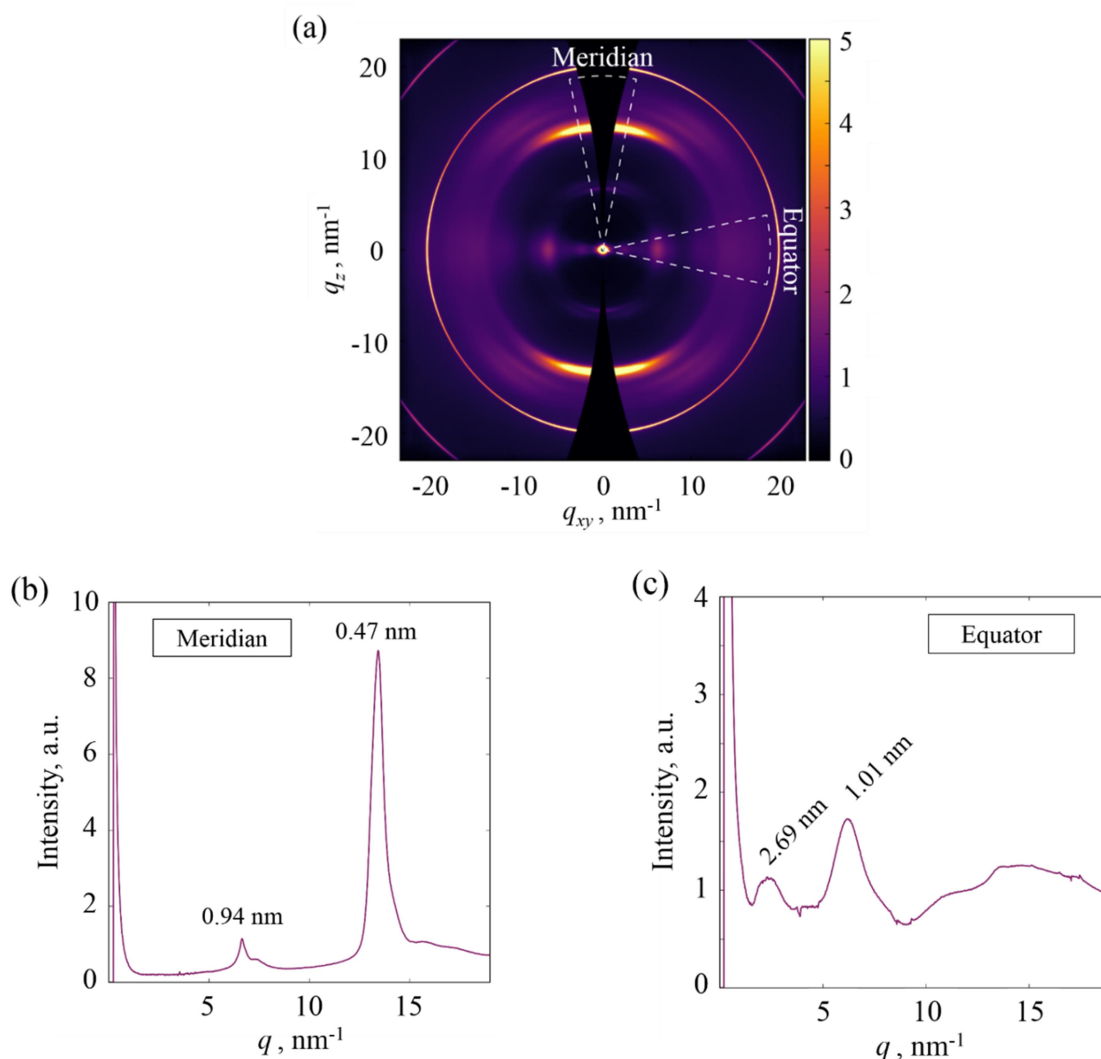


Figure C.16 : Cliché 2D et profils 1D (équatorial et méridional) SAXS/WAXS de fagots de fibres HET obtenus sur la ligne ID13 à l'ESRF. (a) Les deux anneaux très fin et bien définis du cliché 2D sont imputables au sel résiduel dans l'échantillon. Quatre pics de Bragg sont attribuable à la structure des fibres, deux selon l'orientation méridionale (0,94 et 0,47 nm) (b) et les deux autres selon l'axe équatorial (2,69 et 1,01 nm) (c).

Deux pics de diffusion sont détectés, typique de distances de 0,47 et 0,94 nm, suivant l'axe méridional et correspondent respectivement à la longueur et deux fois la longueur des liaisons-H inter brin- β au sein des feuillets- β . Selon l'axe équatorial, deux pics caractéristiques de distances égales à 1,01 et 2,69 nm sont visibles. Le premier, assez intense, est typique de la distance inter feuillets- β (≈ 1 nm). La présence additionnelle du second pic témoigne de la structure globalement cylindrique des fibres HET qui forment un solénoïde^{170,171}. Le fait que l'intensité de ce pic soit plus faible semble cependant indiquer que cette structure typique de solénoïde soit détériorée. La figure de diffraction tend alors à ressembler à celle obtenues typiquement avec de petits peptides amyloïdes¹⁷². Cette détérioration de la structure solénoïde peut-être due à la faible humidité atmosphérique lors de ces mesures (HR < 40%).

II.2.2. ii) Etude de l'interaction eau-fibres par diffusion des neutrons

L'interaction eau-fibres a été étudiée par diffusion des neutrons (SANS : Small-Angle Neutron Scattering) sur un échantillon composé d'une centaine de fagots de fibres secs alignés sur une feuille de mica (**Figure C.17** et **Matériels et Méthodes III.2.2.**). L'hydrogène a un fort pouvoir diffuseur pour les neutrons. Il s'agit du principal élément diffuseur de la matière organique. De plus, son isotope deutérium, ^2H ou D, possède un pouvoir diffuseur encore plus élevé. L'échange isotopique H/D est par conséquent un procédé souvent employé dans le but d'étudier la position des molécules d'eau dans les matériaux hydratés. Pour cela, il suffit de placer l'échantillon dans une atmosphère humidifiée par du D_2O au lieu d' H_2O . C'est ce qui a été effectué grâce aux chambres à atmosphère contrôlée montées sur les instruments D16 et D19 à l'ILL.

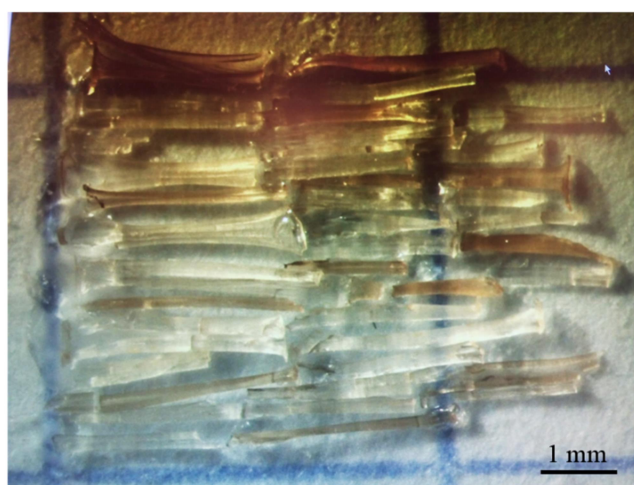


Figure C.17 : Image montrant une partie de l'échantillon caractérisé par diffusion des neutrons : une centaine de "fagots" constitués de fibres HET alignées sont obtenus en séchant des gouttes d'échantillon ($\sim 40 \mu\text{L} = 1$ fagot) entre deux pointes (cf. **Matériels et méthodes III.2.2.**) puis collés sur une feuille de mica en respectant le meilleur alignement possible.

Lors des expériences de diffusion neutronique sur l'instrument D16, deux pics de Bragg ont été détectés et étudiés. Le premier est observé selon l'axe équatorial et le second selon l'axe méridional, pour reprendre les conventions d'orientation employées pour la diffusion des RX.

Les **Figures C.18 (a)** et **C.19** montrent les clichés 2D et profils 1D de ces pics obtenus à haute ($> 90\%$ HR) et basse (50% HR) humidité. Le pic détecté aux petits angles suivant l'axe équatorial (**Figure C.18 (a)**) évolue avec les variations d'humidité. Ce phénomène est particulièrement souligné par la **Figure C.18 (b)** montrant l'évolution de la position de ce pic avec l'augmentation de l'humidité relative ambiante entre 50 et 100%. A une HR de *ca.* 50 %, le pic est peu intense et bien défini pour une valeur de vecteur de diffusion $q = 1,68 \text{ nm}^{-1}$, ce qui correspond à une organisation de périodicité d égale à 3,75 nm dans la structure de l'échantillon. Lorsque l'humidité augmente de 50 à $> 90\%$, la position du pic reste d'abord stable, entre 50 et *ca.* 58 % d'HR puis se rapproche progressivement des faibles valeurs de q , ce qui signifie que la distance d augmente. Celle-ci atteint plus de 4,5 nm à très forte humidité

(HR > 90%). La différence entre les périodicités mesurées à haute humidité entre les expériences présentées sur la **Figure C.18 (a) et (b)** (respectivement 5,44 nm et 4,59 nm) vient de la différence de température ($T =$ respectivement 40 et 25 °C) à laquelle a été réalisée l'expérience. En effet, à haute humidité, la température a également une influence sur la position de ce pic (données non montrées).

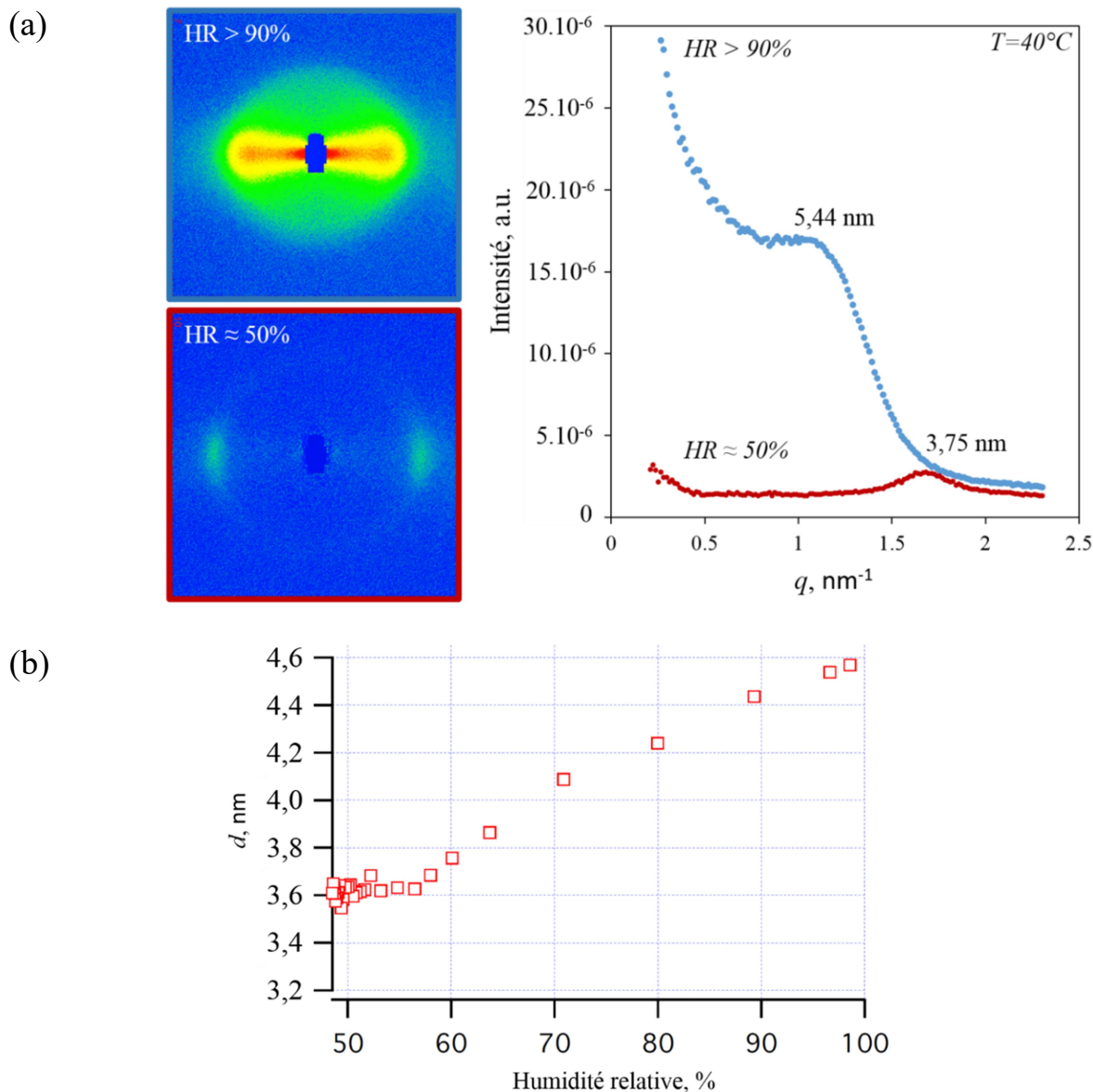


Figure C.18 : (a) Clichés 2D et profils 1D (équatorial) SANS obtenus à haute (> 90% HR) et basse (50% HR) humidité (respectivement encadrés bleu et rouge et graphe bleu et rouge). (b) Evolution de la périodicité correspondante au pic détecté (figure (a)) en fonction de l'humidité de la chambre où est placé l'échantillon. La température est fixe = 40°C (a) = 25°C (b).

Par ailleurs, avec l'augmentation de l'humidité, l'intensité du signal s'accroît considérablement à proximité du "beam stop" toujours suivant l'axe équatorial. Cela peut être dû à un pic de diffraction situé à très petits angles, à la limite de détection de l'instrument, et d'intensité croissant avec l'augmentation de l'humidité.

Cette périodicité est proche de la dimension du diamètre des fibres (4 à 6 nm). Ce pic de diffusion est attribué à la diffusion des atomes de D situés à la surface des fibres, soit à l'eau lourde interagissant avec les fibres. Cette expérience ne permet pas de déterminer directement si l'augmentation de cette périodicité est provoquée par un gonflement des fibres et/ou par l'écartement des fibres entre elles à mesure que de l'eau est adsorbée par l'échantillon. Cependant le niveau d'humidité seuil d'environ 58 % à partir duquel cette périodicité commence à augmenter significativement correspond au niveau d'humidité marquant la transition entre les phases 2 et 3 de l'isotherme de sorption de l'eau des fibres. Il s'agit donc principalement de l'eau considérée comme libre qui est responsable de l'accroissement de la périodicité, soit plutôt de l'eau située entre les fibres. De plus, avec l'accroissement de l'humidité on note une intensification du rayonnement diffracté dans toutes les directions pour des valeurs de q inférieures ou égales à ce pic. Ceci indique que le désordre augmente au sein de l'échantillon, autrement dit, les fibres bénéficient davantage de degrés de mouvement. Il paraît donc indéniable que de l'eau s'infiltre entre les fibres. Néanmoins, il n'est pas exclu que les fibres gonflent légèrement avec l'augmentation du nombre de molécules d'eau s'accumulant dans leurs interstices, en particulier dans les deux canaux d'eau identifiés par simulation de dynamique moléculaire.

La position du second pic (**Figure C.19**) reste inchangée quel que soit l'humidité. Celle-ci correspond à une périodicité de 0,46 nm qui est attribuée, en accord avec les données de SAXS/WAXS, à la longueur de la liaison-H entre deux brins- β . L'accroissement de l'intensité de diffusion avec l'augmentation de l'humidité est imputable à l'augmentation de la concentration en D₂O et donc de la diffusion des neutrons.

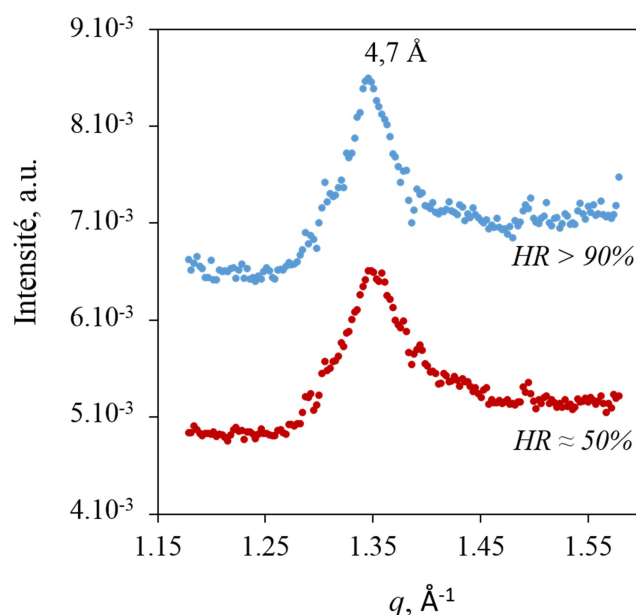


Figure C.19 : profils 1D (méridional) obtenus à haute (> 90% HR) et basse (50% HR) humidité (respectivement en bleu et rouge). Les diffractogrammes correspondants ne sont pas montrés car les pics sont peu intenses donc peu visibles. La température est fixe = 25°C.

Deux clichés 2D SANS ont été réalisés sur l'instrument D19 de l'ILL à température ambiante constante et à HR = 80% et HR = 50%, toujours en atmosphère D₂O. Les diffractogrammes obtenus sont très semblables (**Figure C.20**). Les positions des pics de Bragg sont résumées par la **Figure C.20 (b)**. Tous les pics caractéristiques de la structure des fibres amyloïdes identifiés SAXS/WAXS sont également détectés ici. Les tâches correspondantes aux périodes de 0,43-0,47 nm et 0,83-1 nm selon l'axe méridional sont donc attribuables à respectivement 1x et 2x la distance entre deux brins- β au sein des feuillet- β . De même, la période de 1 nm selon l'axe équatorial correspond à la distance inter feuillet- β dans le cœur de la fibre. De plus, toujours selon l'axe équatorial, une seconde tâche d'intensité comparable à cette dernière et correspondant à une période comprise entre 1,7 et 2-3nm (plus intense à haute humidité) est détectée. De la même manière que décrit au paragraphe **II.2.2. i)**, ceci constitue la signature typique de la structure solénoïde quasi cylindrique des fibres HET^{171,172}.

La dernière tâche de diffraction s'étalant entre 0,31 et 0,24 nm ne se rapportent pas à une caractéristique structurale connue des fibres HET.

Il est à noter que les changements induits par les variations de l'humidité sur les diffractogrammes obtenus aussi bien sur les instruments D16 que D19 sont totalement réversibles (données non montrées).

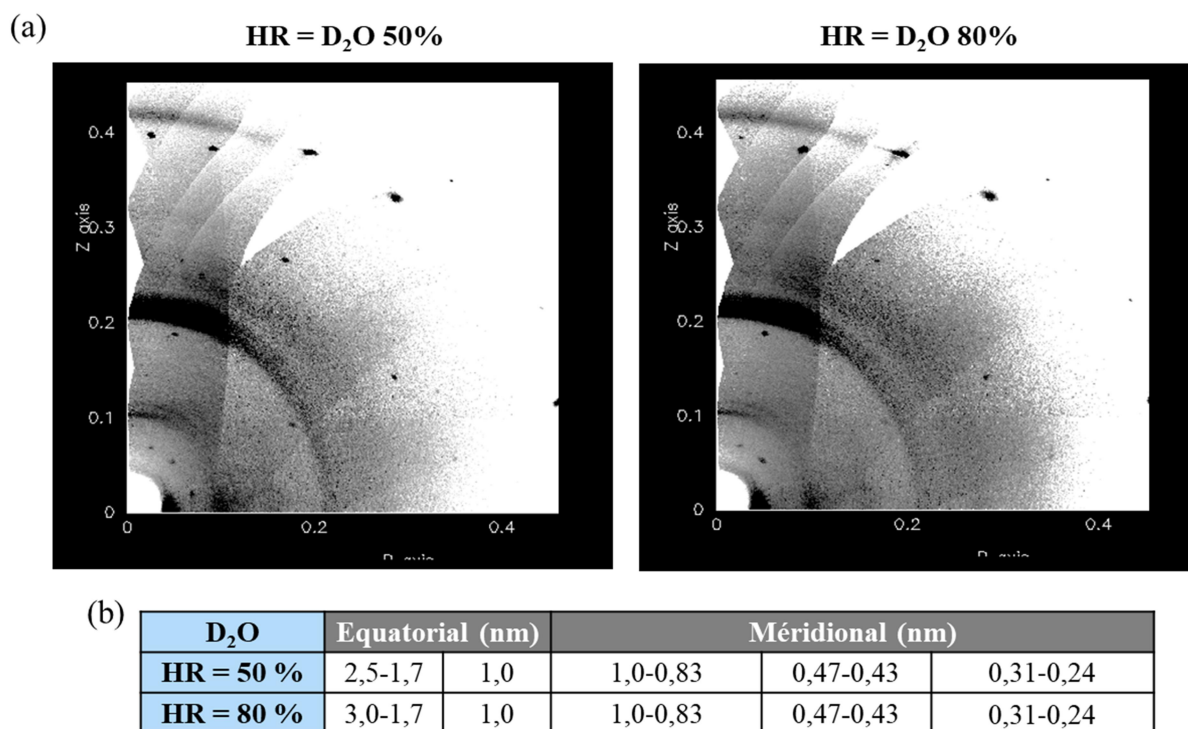


Figure C.20 : Clichés 2D SANS de fagots de fibres HET obtenus sur l'instrument D19 à 50 (gauche) et 80 % (droite) d'humidité relative en atmosphère D₂O. (b) Récapitulatif des distances correspondantes aux pics de Bragg. Seule la position du pic détecté aux plus petits angles selon l'axe équatorial (flèche en rouge) évolue avec l'humidité.

L'expérience de diffusion des neutrons (instrument D16 @ ILL) montre que de l'eau s'infiltre autour des fibres constituant les fagots avec l'augmentation de l'humidité. Ces observations rejoignent celles d'une étude de RMN du solide réalisée par Van Melckebeke H. *et al.* d'un échantillon de fibres HET extrêmement concentré (obtenu en culottant les fibres par ultracentrifugation). Celle-ci a montré entre autres que les résidus périphériques des fibres étaient accessibles au solvant et qu'il ne pouvait y avoir de surface sèche étendue entre les fibres¹⁴⁸. De plus, l'ensemble de ces résultats de diffusions des neutrons montrent que la structure interne des fibres en feuillets- β , caractéristique générique des fibres amyloïdes, n'est pas affectée par l'hydratation de l'échantillon dans la gamme d'HR étudiée. Seules des modifications réversibles d'éléments structuraux de plus grande période (~ 2 nm et ~ 4 à 5 nm) sont observées. Les interactions inter-fibres sont notamment modifiées puisque ces dernières s'éloignent les unes des autres avec l'hydratation de l'échantillon et se rapprochent lors de la déshydratation. Cela est en accord avec l'étude de Wan & Stubbs sur l'effet de la déshydratation sur un échantillon de fibres HET par diffraction des RX¹⁷² qui montre également que seules les interactions inter-fibres sont affectées : ces dernières augmentent avec la déshydratation de l'échantillon. Cependant, cette étude montre également que ces altérations ne sont pas entièrement réversibles mais la déshydratation de l'échantillon est alors beaucoup plus poussée (jusqu'à 0 %) que dans notre cas. La structure des fibres amyloïdes étant extrêmement robuste¹²⁴, on peut supposer que nos observations sont également valides pour des HR < 50 % tant que ces conditions extrêmes (HR < 1 %) ne sont pas atteintes. Ainsi, nous pouvons considérer que lors de nos caractérisations électriques (HR toujours comprise entre 40 et 80 %), les variations de conductivité des fibres ne sont pas dues à une modification de la structure intrinsèque des fibres. Ces variations de conductivité, d'ailleurs également réversibles, peuvent en revanche être provoquées par l'adsorption d'eau dans les deux canaux mis en évidence par simulation numérique et autour des fibres.

II.3. Mécanisme(s) de transport de protons

II.3.1. Effets de l'adsorption d'eau : Spectroscopie d'Impédance Electrochimique

L'impact de l'hydratation des fibres HET sur les mécanismes de transport de charge supportés par ces dernières a été étudié par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS : Electrochemical Impedance Spectroscopy). Cette technique permet d'étudier les systèmes électro-actifs complexes, notamment dans lesquels plusieurs processus de transport interviennent. Pour cette caractérisation, un film de fibres HET de concentration ≈ 250 μ M est déposé sur un substrat à électrodes interdigitées en or (surface active : 170 mm²) (cf. **Matériels et Méthodes II.2.**). L'échantillon est soumis à un signal sinusoïdal de faible amplitude, 100 mV centré sur 0 V. La réponse électrique de l'échantillon est enregistrée alors que la fréquence du signal d'entrée varie entre 3 MHz et 10 mHz. Sa partie imaginaire est tracée en fonction de sa partie réelle dans une représentation de type digramme de Nyquist.

Vu l'importance de son impact sur la conduction des fibres, l'effet de l'humidité a été analysée avec une attention toute particulière. L'humidité relative est contrôlée grâce à l'enceinte climatique. Quatre à cinq spectres d'EIS sont acquis pour chaque taux d'humidité choisi : HR = 55, 60, 65, 70, 75 et 80%. Les spectres sont reproductibles et un spectre moyen est obtenu pour chaque humidité (**Figure C.19 (a)**) en moyennant les données EIS acquises.

L'interprétation des spectres a été rendue possible par une collaboration établie avec le Dr. Chantal Gondran (UMR5250-DCM). Les points correspondants aux très hautes fréquences et aux basses fréquences sont préalablement supprimés des spectres car leur résolution est insuffisante. Au final, la gamme de fréquence prise en compte s'étend de 0,1 Hz à quelques dizaines de kHz. Les spectres peuvent être déconvolués en trois demi-cercles grâce à un circuit équivalent composé d'une série de trois résistances-capacités (RC) en parallèle (**Figure C.21 (b)**). Les valeurs des résistances et des capacités sont déduites de la modélisation du circuit équivalent et la fréquence de coupure de chaque élément RC est calculée pour chaque humidité (**Figure C.22**). On remarque que les spectres obtenus à 75 et surtout 80 % d'humidité ne concordent pas tout à fait avec les spectres calculés à l'aide du circuit équivalent. Les valeurs de R, C et f issues de ces spectres sont donc à considérer avec prudence. Pour l'analyse des résultats, on ne tient pas compte de la mesure à HR = 80 %.

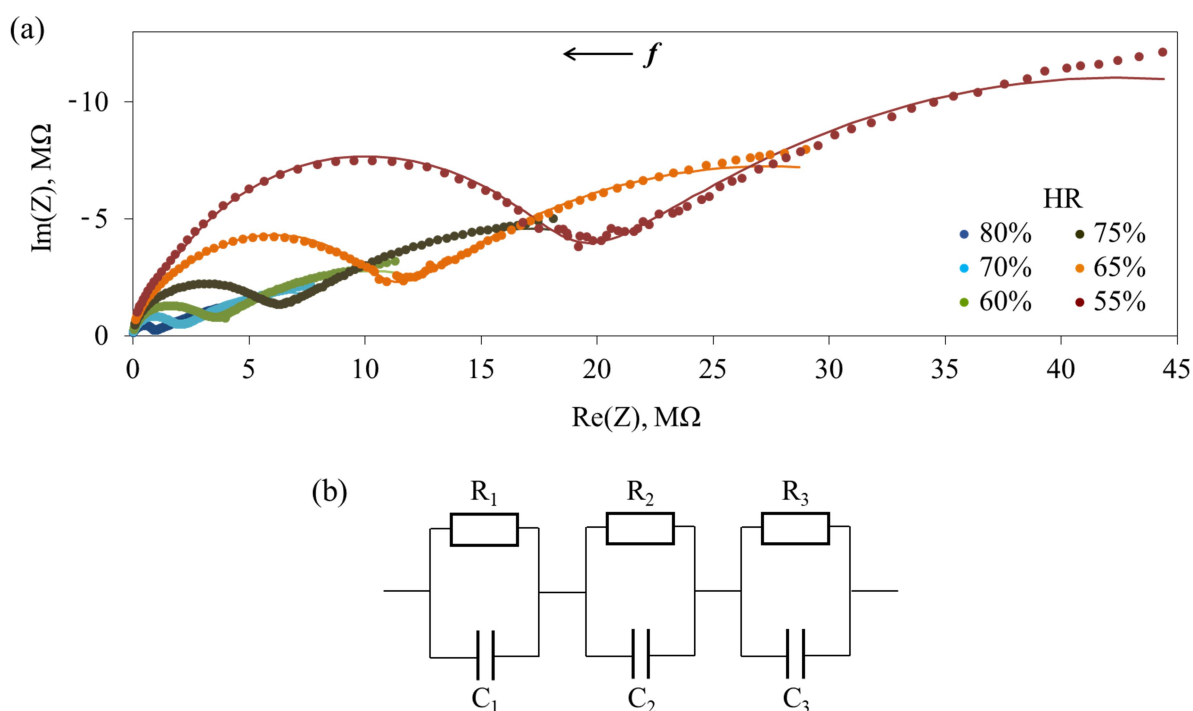


Figure C.21 : (a) Représentation de Nyquist des spectres d'EIS obtenus à différentes humidités (points) et des spectres modélisés à l'aide du circuit équivalent présenté ci-dessous (traits). La flèche indique le sens croissant des fréquences (f). (b) Circuit équivalent modèle utilisé pour l'interprétation des données. Les deux premiers éléments du circuit, R_1C_1 et R_2C_2 correspondent à deux demi-cercles identifiés aux fréquences les plus hautes (ceux-ci se recouvrent en très grande partie sur le diagramme de Nyquist ce qui fait qu'un seul demi-cercle global est aisément visible aux hautes fréquences). La dernière composante R_3C_3 se rapporte au demi-cercle présent aux plus basses fréquences des spectres.

Les trois éléments RC se rapportent à trois phénomènes électriques se produisant au sein du système étudié. Etant donné que ces éléments sont en série, les charges traversant le système passent successivement par ces trois composantes. La gamme de fréquences de ces phénomènes (f_1 , f_2 et f_3) indique que ces processus électrochimiques impliquent plutôt des ions que des électrons. En effet, ces derniers ayant une mobilité bien supérieure à celle des ions, les fréquences caractéristiques des processus électrochimiques impliquant des électrons sont également supérieures. Le troisième élément (R_3 , C_3 , f_3) est attribué à un effet à l'interface électrodes/fibres. En effet, il présente une fréquence caractéristique très inférieure aux deux autres ainsi que les valeurs de résistance et de capacité les plus grandes. Les deux autres processus électrochimiques ayant lieu dans ce système R_1C_1 et R_2C_2 , sont certainement intrinsèques au film de fibres. En effet, deux types de processus de transport de charge doivent être envisagés : les processus intra- et inter-fibres. f_1 est légèrement supérieure à f_2 ce qui signifie que ce processus est plus aisé que le deuxième.

Comme de montre la **Figure C.22**, le taux d'humidité influe sur ces trois processus entre HR = 55 et 75 %. A chaque fois, la capacité varie inversement à la résistance. Cela peut-être expliqué par une modification du facteur géométrique du matériau. En effet :

$$R = \rho \times \frac{L}{S} \quad ; \quad C = \varepsilon \times \frac{S}{L} \quad \left| \begin{array}{l} \text{Avec } \rho \text{ la résistivité et } \varepsilon \text{ la permittivité diélectrique} \\ \text{du matériau, } S \text{ la section du matériau et } L \text{ sa} \\ \text{longueur.} \end{array} \right.$$

R_3 diminue de 50 à 9 M Ω et C_3 augmente de 23 à 80 nF. Cela signifie que la surface d'interface électrode/matériau augmente avec l'humidité. L'humidité améliore donc le contact des fibres sur l'électrode ce qui favorise les phénomènes électrochimiques d'interface : f_3 augmente légèrement.

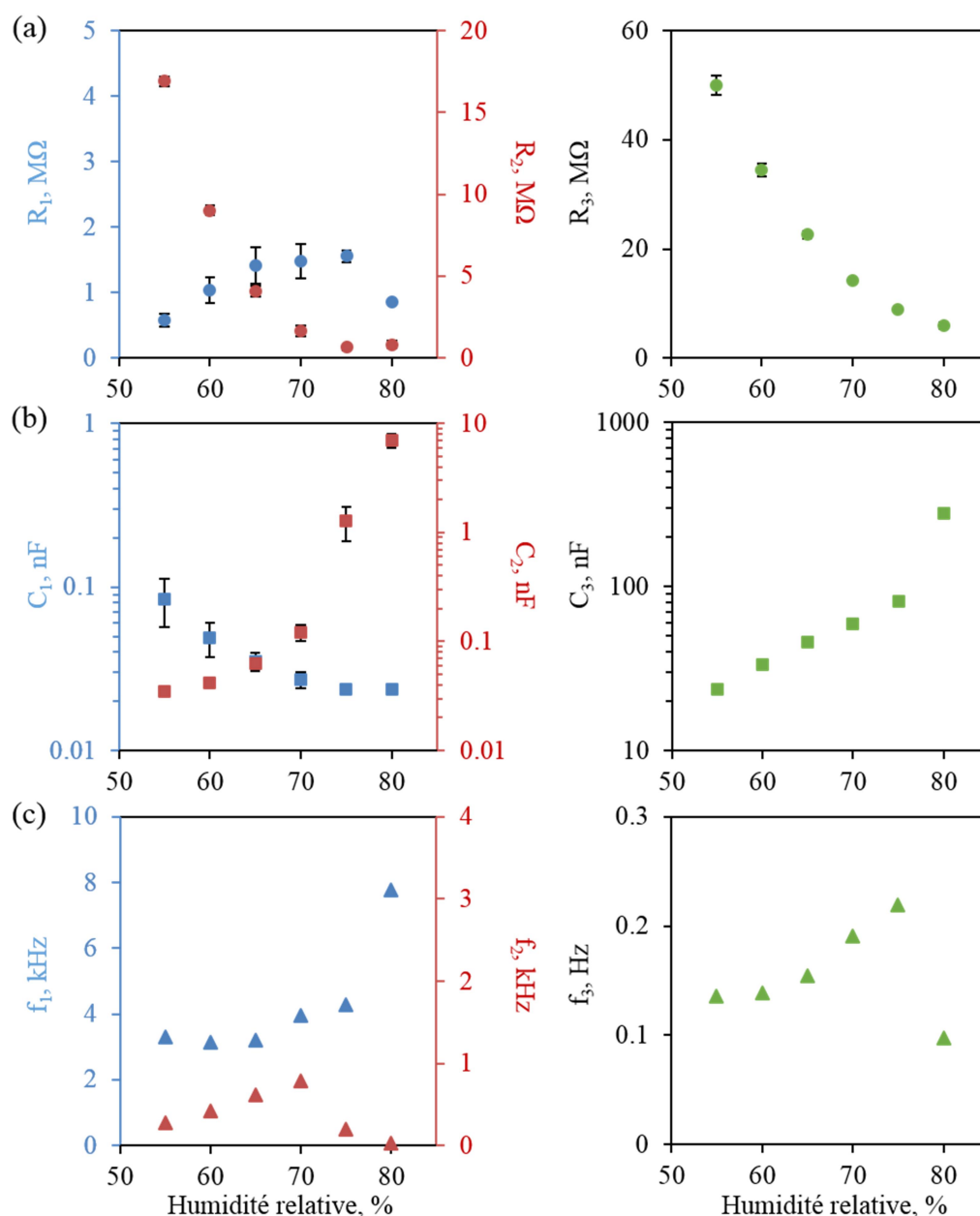


Figure C.22 : Effet de l'humidité sur (a) les résistances R_1 , R_2 , R_3 , (b) les capacités C_1 , C_2 , C_3 et (c) les fréquences caractéristiques f_1 , f_2 , f_3 .

Les deux processus de transport internes au film, caractérisés par R_1C_1 et R_2C_2 , sont influencés par l'humidité de manière opposée. En effet, avec l'augmentation de l'humidité, R_1 augmente entre 500 k Ω et 2 M Ω et C_1 diminue légèrement entre environ 100 pF et 20 pF, alors que R_2 diminue de 17 M Ω à 600 k Ω et C_2 augmente de 23 à 80 nF. La fréquence caractéristique f_1 reste stable autour de 4 kHz et f_2 augmente légèrement de 300 à 800 Hz. Seul la valeur de f_2 à 75 % d'humidité (200 Hz) sort de cette tendance. Ce point aberrant découle certainement du fait que l'analyse des données aux hautes humidités (> 75 %) avec le circuit équivalent adopté est moins précise. Nous attribuons le premier mécanisme au processus de transport inter-fibres et le second à l'intra-fibres. En effet, les expériences précédentes ont montrées que lors de l'adsorption d'eau par l'échantillon, les molécules d'eau

peuvent se lier facilement à la périphérie des fibres, notamment au niveau des deux canaux d'eau. Cela provoque d'une part le "gonflement" de ces canaux qui se remplissent, la section S augmente donc R_2 diminue et C_2 augmente. D'autre part l'infiltration entre de molécules d'eau entre les fibres les éloigne les unes des autres. Cela implique que la surface de contact entre fibres donc R_1 augmente et C_1 diminue. On note que cette influence de l'humidité est beaucoup moins forte sur le mécanisme inter fibres que sur l'intra fibres.

Ainsi, deux aspects de la conduction de protons au sein des films ont été mis en évidence et étudiés par EIS comme attendu : le transport inter-fibres et le transport intra-fibres. Ces deux mécanismes sont influencés de façon inverse par l'adsorption d'eau par l'échantillon. L'adsorption d'eau rend le mécanisme de transport intra-fibres plus efficace en renforçant les deux canaux d'eau et la couche d'hydratation des fibres via lesquels le mécanisme de Grotthuss peut se produire. Dans le même temps, le transport de proton inter-fibres est plus difficile à cause de l'augmentation de la distance inter-fibres due à l'eau adsorbée. En combinant ces résultats avec la dépendance de la conductivité en fonction de la quantité d'eau adsorbée par les fibres, on peut déterminer une limite d'HR d'environ 65-70 % à partir de laquelle la conductivité du film commence à être affectée par l'accroissement de la distance inter-fibre. De plus, en dessous d'environ 40-50 % d'HR, la conductivité du film est très faible et indétectable par l'appareil de mesure (courant $< 10^{-10}$ A). Il s'agit aussi de l'humidité minimale nécessaire afin que les mécanismes de conduction intrinsèques aux fibres HET puissent se produire (cf. **Résultats et Discussion I**). Ainsi une HR comprise entre 40 et 50 % constitue vraisemblablement le seuil de percolation permettant la conduction de protons. D'après l'isotherme de sorption, on peut estimer à environ $30^{\pm 4}$ le nombre de molécules d'eau par sous-unité HET nécessaires.

II.3.2. Reconsidération de l'effet de l'humidité sur la conductivité des fibres HET

Les dépendances de l'intensité de courant enregistré à DDP fixe (0,8 V = régime I et 3,0 V = régime II) en fonction de l'humidité relative sont retracées non pas en fonction de l'HR mais du pourcentage massique d'eau adsorbée par l'échantillon de fibres (**Figure C.23**). Ceci est réalisé grâce à l'isotherme de sorption de l'eau présenté **Figure C.15**. Ces dépendances restent exponentielles mais deux pentes se distinguent sur la représentation logarithmique : la conductivité de l'échantillon augmente avec l'adsorption d'eau plus rapidement entre 40 et environ 65-70 % d'HR qu'au-delà de ces 70 % d'HR. En dessous de 40-50 % d'HR, les niveaux de courants sont trop faibles pour être détectés avec notre équipement.

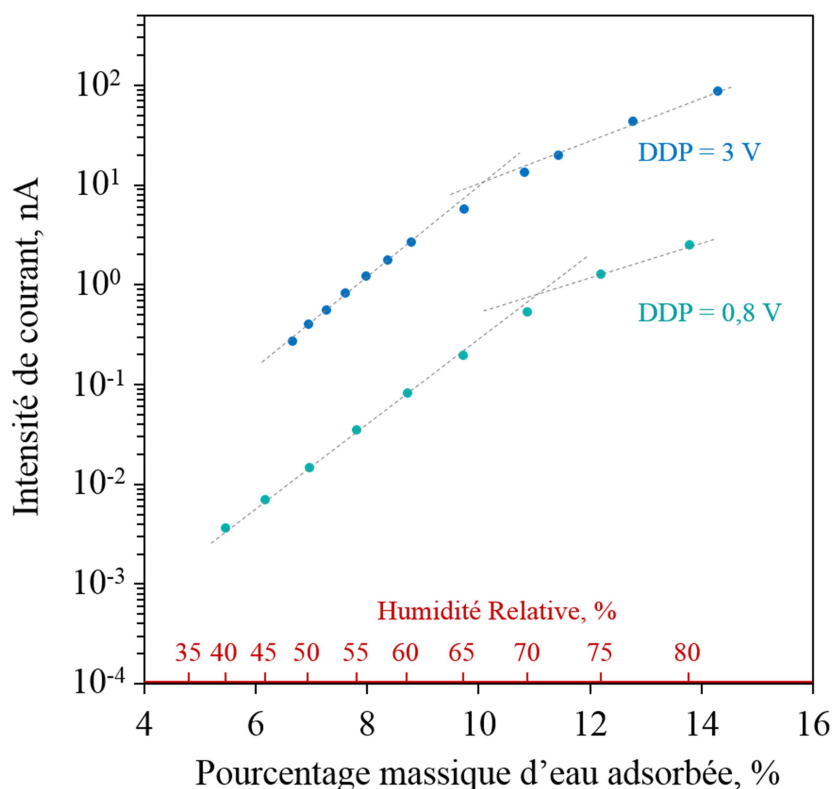


Figure C.23 : Effet de l'adsorption d'eau sur la conductivité des fibres HET dans les deux régimes de conduction.

Les résultats d'EIS présentés juste auparavant montrent que deux mécanismes de conduction, intra et inter fibres, contribuent à la conductivité globale des films. L'humidité influence ces deux mécanismes de façon inverse : le mécanisme intra fibres est amélioré tandis que l'inter fibres devient un peu moins efficace. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, ce seuil de 65-70 %, correspond à la limite d'HR relevée sur l'isotherme d'adsorption d'eau marquant la fin de la constitution de la couche d'hydratation de la protéine (en particulier la formation des canaux d'eau) et l'adsorption d'eau libre entre les fibres. En accord avec les données de diffusion des neutrons, il s'agit donc du niveau d'humidité au-delà duquel, les fibres commencent à s'éloigner notablement les unes des autres à cause de cette adsorption d'eau. Ainsi, pour les HR < 58 % (phase pendant laquelle la distance centre-à-centre entre les fibres reste constante d'après l'expérience de diffusion des neutrons), l'augmentation de la conductivité des fibres découle de l'amélioration de la conduction intra-fibres. Au-delà du seuil de HR = 65-70 %, l'espacement des fibres à cause de l'infiltration d'eau dans les espaces inter fibrillaires devient plus important ce qui fait que la conduction inter fibres devient moins efficace. Cela peut expliquer pourquoi la dépendance semble atteindre une saturation. Ceci est résumé par la **Figure C.24**.

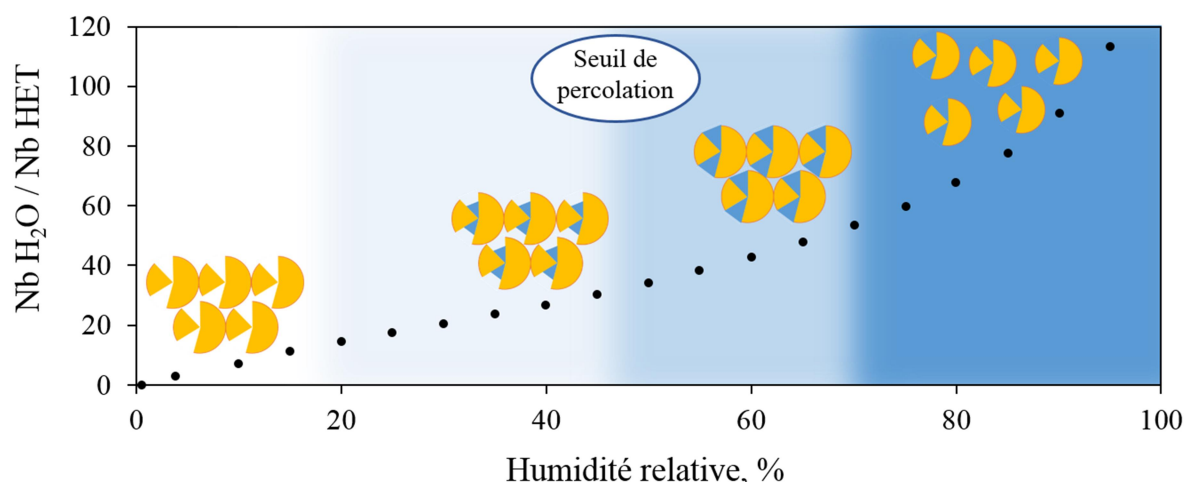


Figure C.24 : Schéma synthétique représentant cinq fibres HET vues transversalement (en jaune) et le remplissage de leurs deux canaux d'eau avec l'augmentation de l'humidité relative (HR). À partir d'environ 40-50% d'HR, les canaux possèdent une densité de molécules d' H_2O suffisante pour que les protons percolent: la conduction se met en place. En augmentant l'HR jusqu'à environ 70%, les molécules d'eau adsorbées continuent de remplir les canaux et les fibres restent en contact assez étroit. La conductivité du film s'améliore. Au-dessus de 70% d'HR, la quantité d'eau libre au sein de l'échantillon devient importante. La distance entre les fibres augmente c'est pourquoi le mécanisme de conduction inter-fibres se dégrade.

II.3.3. Effet du pH sur la conductivité des films de fibres HET

La concentration en proton dans l'échantillon est bien évidemment un paramètre pouvant influencer de manière importante la conduction protonique, c'est pourquoi une étude de l'influence du pH sur la conduction des échantillons de fibres HET a été réalisée. Des échantillons de fibres à différents pH, pH 5,8 ; 6,4 ; 7 ; 7,7 et 8, ont été élaborés à partir de la même préparation de fibres HET ordinairement formées dans l'HCl 100 μM pH4 et de concentration en protéines 600 μM . Pour ce faire, une goutte de 40 μL de fibres à pH4 est immergée dans un volume beaucoup plus grand (typiquement 1-2 mL) de tampon phosphate salin (PBS) 50 mM de pH désiré. Sous l'effet combiné de la force ionique et du pH, la goutte d'échantillon prends immédiatement en masse pour former un gel. On remarque que le gel est d'autant plus dense que le pH est élevé. Ceci est dû à la modification des interactions inter-fibres comme expliqué en introduction (cf. **Introduction III.1.**). Après retrait du tampon PBS superflu, le gel est récupéré, déposé entre les électrodes de carbone vitreux utilisées pour les caractérisations électriques et laissé à sécher sous atmosphère ambiante.

Des films formés de la même façon à pH 5,8 ; 7 et 8 ont été déposés sur des lames de verre et caractérisés par microscopie à force atomique (AFM : Atomic Force Microscopy). L'effet du pH sur l'arrangement inter-fibres est bien visible. Les fibres forment un réseau très dense et désordonné. Des associations latérales inter-fibres de plus en plus importantes s'établissent avec l'augmentation du pH, jusqu'à former d'épais faisceaux à pH8 (**Figure C.25**).

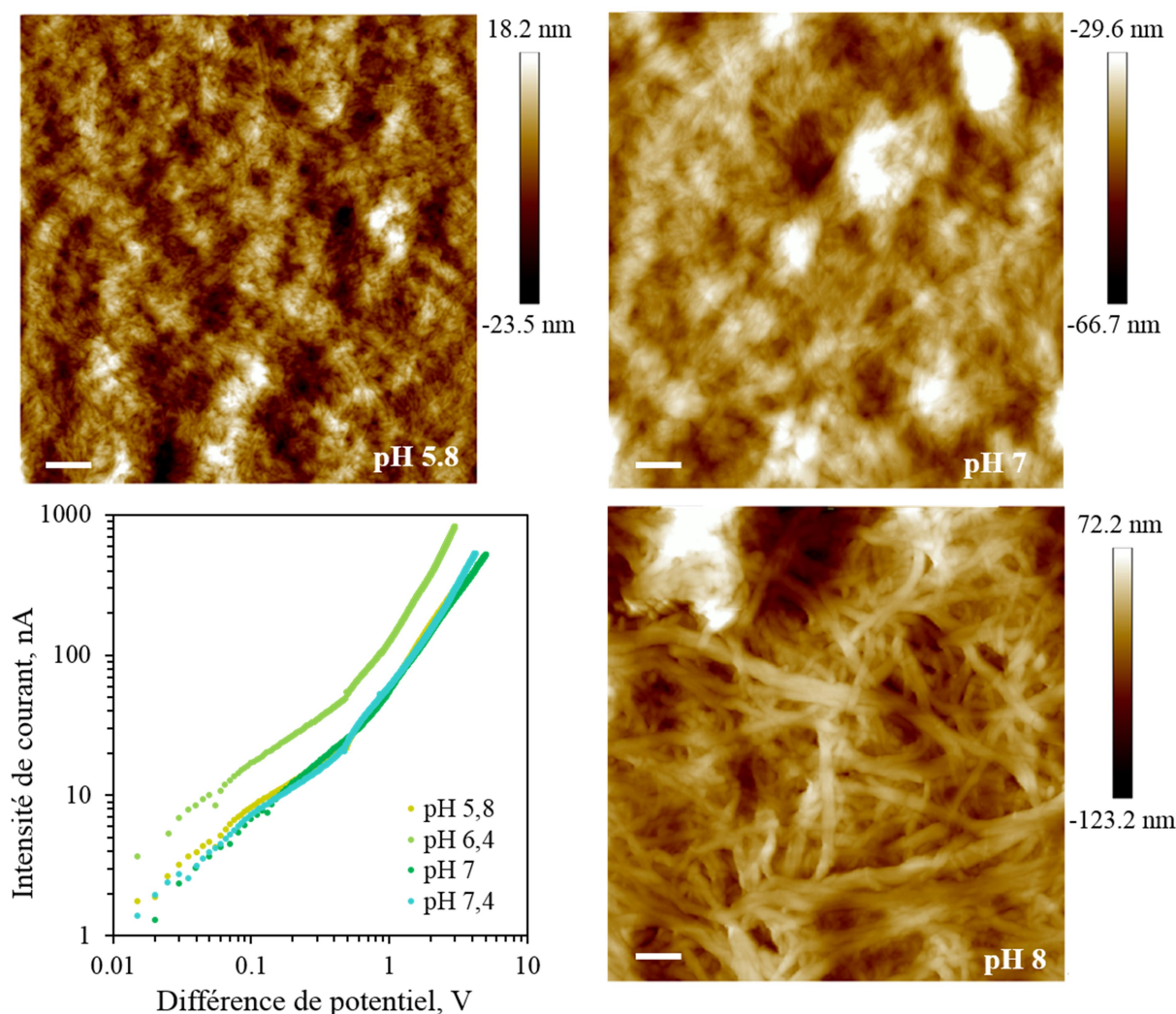


Figure C.25 : Images AFM des films de fibres HET à pH 5,8 7 et 8, échelle = 200 nm, et caractéristiques I - V acquises pour les films de fibres HET à pH 5,8 ; 6,4 ; 7 et 7,4.

Les caractéristiques I - V entre 0 et 5 V de ces films montrent un comportement très similaire à celui des films de fibres à pH4 avec au moins deux régimes de conduction et une transition régime I $\Rightarrow$ régime II bien marquée entre 0,5 et 1,0 V (**Figure C.23**). Étonnamment, les niveaux de courant enregistrés sont très similaires pour tous les échantillons. Seul celui à pH 6,4 possède un niveau de conduction légèrement supérieur, tout en restant du même ordre de grandeur. Ce résultat est confirmé par des mesures I - t en fonction de l'humidité, réalisée selon le même protocole que précédemment (cf. **Résultats et Discussions I.2.1.i**) pour chacun des échantillons. Les niveaux de courant enregistrés à HR = 50 % et HR = 70 %, à température ambiante, sont relevés à partir de ces dépendances. Là encore, les niveaux de courant enregistrés restent du même ordre de grandeur quel que soit le pH de l'échantillon (**Figure C.26**) et ce dans les deux régimes de conduction étudiés (DDP de 0,8V pour le premier et de 3,0V pour le deuxième).

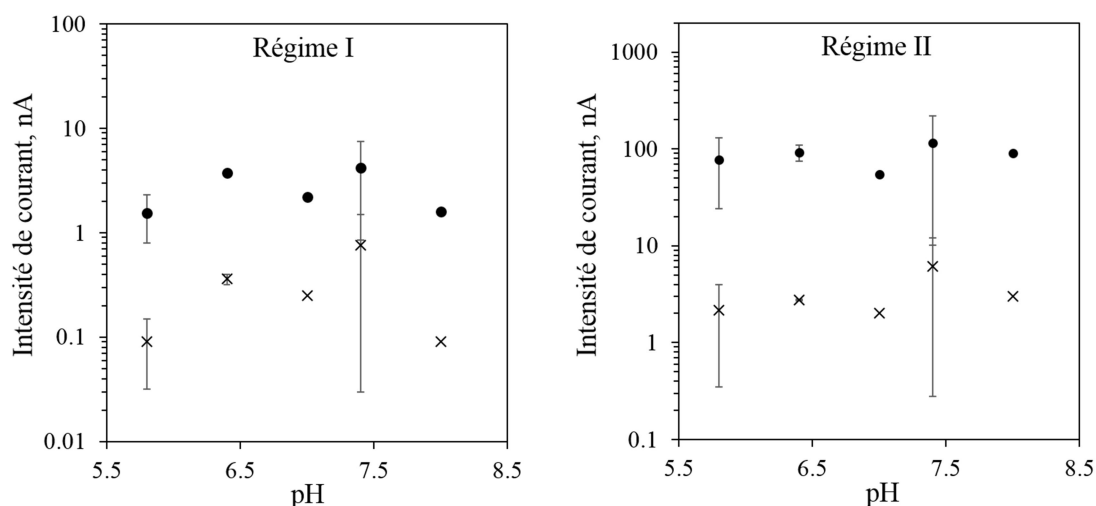


Figure C.26 : Effet du pH sur la conduction des fibres HET dans les deux régimes de conduction. Les points correspondent au niveau de courant relevé à haute humidité (HR = 70 %) et les croix à "basse" humidité (HR = 50 %).

Ce résultat était inattendu. En effet, de façon générale, la conductivité d'un matériau augmente lorsque le nombre de porteurs de charge augmente. Dans le cas d'un matériau conducteur de protons comme, la conductivité devrait donc être sensible aux variations de concentration en protons dans le matériau, soit augmenter avec la diminution de pH selon une loi de puissance. Néanmoins, il est possible que la variation de concentration en proton de l'environnement n'influence pas la conduction dans le cas où celle-ci est restreinte dans un espace confiné, par exemple dans des nano-canaux ou des matériaux nano-poreux. Dans ce cas, la conduction protonique est gouvernée par la charge surfacique du canal de conduction et n'est pas influencée par les autres charges libres^{173,174}. Cette expérience suggère donc que la conduction se passe majoritairement dans un espace très restreint autour des fibres dont la surface possède de nombreux résidus chargés (Cf. **Introduction III.3.**), soit dans la couche d'hydratation des fibres. On remarque que les deux canaux de molécules d'eau stables mis en évidence par la simulation numérique en font partie.

D'autre part, les associations latérales entre les fibres, visibles sur les images d'AFM, n'impacte pas non plus la conductivité des films. La conductivité des films formés de gros câbles à pH8 est similaire à celle des films à pH 5,8 où les fibres individuelles forment peu d'associations étendues. Cela implique que les mécanismes de conduction sont intrinsèques aux fibres individuelles quelle que soit leur organisation supra-fibrillaire.

Cette expérience n'a pu être répétée que deux fois, ce qui explique les barres d'erreur importantes, notamment pour l'échantillon pH7. Il sera nécessaire de la répéter afin de s'affranchir des variations liées à la qualité d'élaboration des films biologiques et valider définitivement cette observation.

II.4. Conclusion

Ce chapitre montre qu'une conduction de protons peut se produire le long des fibres HET hydratées grâce à la présence d'eau à la surface des fibres. Deux "canaux" formés de molécules d'eau stables, localisées dans la poche semi-hydrophobique et au niveau de l'entrée du cœur hydrophobe des fibres, ont en particulier été mis en évidence par simulation de dynamique moléculaire. Cette eau, qui du reste peut potentiellement participer à la stabilisation de la structure des fibres, forme des réseaux de liaisons-H impliquant molécules d'eau et chaînes latérales polaires des acides aminés. Ainsi, le transport de protons par le mécanisme de Grotthuss est possible le long de ces canaux. Ce processus de conduction intra fibres est confiné à la surface de ces dernières. Un second mécanisme de conduction doit permettre le transfert des protons entre les fibres. La nature de ce mécanisme reste à déterminer. Une possibilité est que ce processus soit de la même nature que le transport intra fibres, c'est à dire par sauts de protons, et qu'il soit assisté par des molécules d'eau.

L'eau étant un élément essentiel au mécanisme de conduction protonique ici impliqué, le degré d'hydratation des fibres influence grandement la conductivité. Le mécanisme de conduction intra-fibres est principalement impacté. Le mécanisme inter-fibre aussi mais dans une moindre mesure. L'adsorption d'eau joue sur la couche d'hydratation des fibres, notamment sur la constitution des deux canaux révélés par simulation numérique. La structure intrinsèque des fibres amyloïdes est, elle, conservée pour toute la gamme d'HR étudiée.

On estime qu'un minimum de 30 molécules d'eau adsorbées par sous-unités HET permet de former un chemin de percolation pour les protons. Cette condition est atteinte lorsque l'humidité relative est au moins comprise entre 40 et 50 %. Lorsque l'humidité relative augmente jusqu'à environ 65-70 %, des molécules d'eau sont adsorbées principalement dans les deux canaux ce qui améliore la conduction intra fibres. A plus haute humidité, de plus en plus d'eau libre est adsorbée autour des fibres ce qui les éloigne les unes des autres. Le transfert de protons inter fibres est alors moins efficace (**Figure C.24**).

III- Effets de la lumière sur la conductivité des fibres HET

Les deux chapitres précédents ont présenté les fibres HET comme un matériau conducteur protonique. La conduction de protons se produit notamment au moyen du mécanisme de Grotthuss au sein de deux canaux d'eau confinés le long des fibres. Cette partie étudie l'effet de la lumière sur la conductivité électrique des échantillons HET sous forme de fibres et de monomères. L'effet premier que peut provoquer la lumière sur certaines molécules concerne des événements électroniques comme la transition d'un électron sur un niveau d'énergie électronique supérieur par absorption de l'énergie lumineuse. Dans les semi-conducteurs électroniques (inorganiques comme organiques), il est notamment possible de (photo)générer des porteurs de charge par irradiation lumineuse via un mécanisme de photo-injection *i.e.* création de paires électron/trou par absorption d'une énergie lumineuse adaptée au gap du semi-conducteur. Aucun effet direct de la lumière n'a été reporté sur les matériaux (semi-)conducteurs protoniques. En revanche, des effets indirects peuvent être envisagés si l'environnement électronique est modifié. La protéine HET possède trois résidus aromatiques pouvant absorber la lumière de longueur d'onde (λ) comprise entre 260 et 280 nm: Y281, W287 et dans une moindre mesure F286. Ceux-ci sont principalement responsables de l'absorption de la lumière des échantillons HET entre 250 et 400 nm (**Figure C.28, encart**). On note que le spectre d'absorption des fibres HET diffère légèrement de celui des monomères. En effet, un pic supplémentaire, difficilement visible mais mis en évidence par le tracé des dérivées secondes des spectres, est visible à *ca.* 303nm avec les fibres. Ceci peut être dû au changement de l'environnement des aromatiques entre la forme monomère de la protéine et son organisation en fibre. Par ailleurs, ces acides aminés sont proches des canaux d'eau conducteurs de protons (**Figure C.27**). Il est donc possible que cette absorption d'énergie par l'échantillon puisse avoir un effet sur la conductivité.

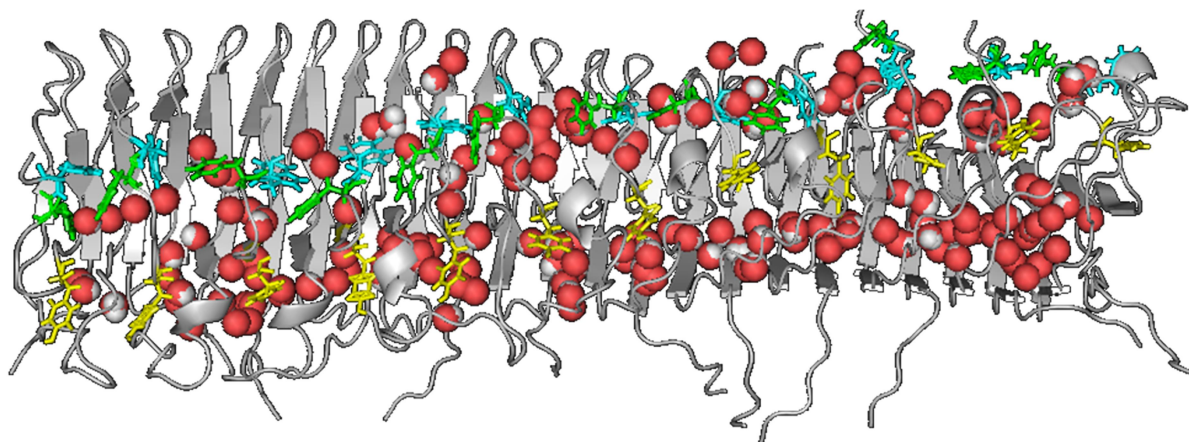


Figure C.27 : Modèle d'une fibre HET de 12 sous-unités montrant l'emplacement des deux canaux d'eau et leur proximité avec les résidus aromatiques : Y281 en jaune, F286 en vert et W287 en bleu.

Le sac à gants présenté au paragraphe **Résultats et Discussions I.2.1. ii))** a été utilisé pour maintenir les conditions atmosphériques choisies (humidité et gaz) constantes. Sauf indication contraire, toutes les mesures présentées ont été acquises à température ambiante et à une humidité relative (HR) assez haute, HR comprise entre 60 et 80%, autorisant une conductivité suffisante des échantillons. Les niveaux de courant sont ainsi au minimum de l'ordre du nA, ce qui permet des mesures électriques stables et reproductibles.

III.1. Effets de la longueur d'onde d'irradiation

III.1.1. Balayage en longueur d'onde

Une première expérience a consisté en l'étude de l'impact de la longueur d'onde d'irradiation sur la conductivité des échantillons de fibres et de monomères HET (**Figure C.28**). L'échantillon considéré est placé dans un spectrofluorimètre (Jasco FP-8500) ayant comme source d'excitation une lampe au xénon. Le courant le traversant est mesuré au cours du temps ($I-t$) à DDP fixe (*i.e.* tension de polarisation constante) pendant que la longueur d'onde éclairant l'échantillon varie de 200 à 700 nm (10 nm.min^{-1}). La largeur à mi-hauteur du faisceau est de 10 nm. Une période de 20 minutes sans irradiation est appliquée après chaque épisode d'éclairement. Ce cycle est répété une dizaine de fois. Cette expérience a été réalisée pour un film de fibres soumis à une DDP de 0,8 V puis 3,0 V ainsi que pour un film de monomères polarisé à 3,0 V. L'humidité relative est quasi-constante pendant la mesure et comprise entre 60 et 70 %.

L'irradiation des échantillons de fibres HET impacte clairement leur conductivité (**Figure C.28**). En revanche, et de manière remarquable, ce n'est pas le cas des monomères pour lesquels aucune fluctuation de courant n'est détectée au cours de la mesure. Cet effet sur la conductivité des fibres est de surcroît différent selon le régime de conduction considéré. En effet, un accroissement du courant est visible dans les conditions correspondant au régime I (DDP = 0,8 V) tandis qu'une diminution du courant a lieu dans le cas du deuxième régime (DDP = 3 V) sous illumination. Ces phénomènes sont robustes et reproductibles, cycle après cycle. De plus, ce résultat a été confirmé avec un second échantillon de fibres HET. Enfin, la même expérience a été menée mais en restreignant le balayage en longueurs d'ondes à l'intervalle 400-700 nm et seulement pour des échantillons de fibres HET polarisés avec une DDP de 3 V. Cette fois, aucune variation d'intensité de courant n'est enregistrée. Les effets décrits précédemment (*vide supra*) sont donc provoqués par l'irradiation de l'échantillon à des longueurs d'onde comprises entre 200 et 400 nm.

On remarque la décroissance progressive du courant au cours du temps décrite par la **Figure C.5** sauf pour la mesure du film de fibres à 0,8 V. En effet cette dernière a été réalisée juste après la mesure du même échantillon à 3 V et on observe cette fois-ci un effet de décharge (**Figure C.4 (b)**).

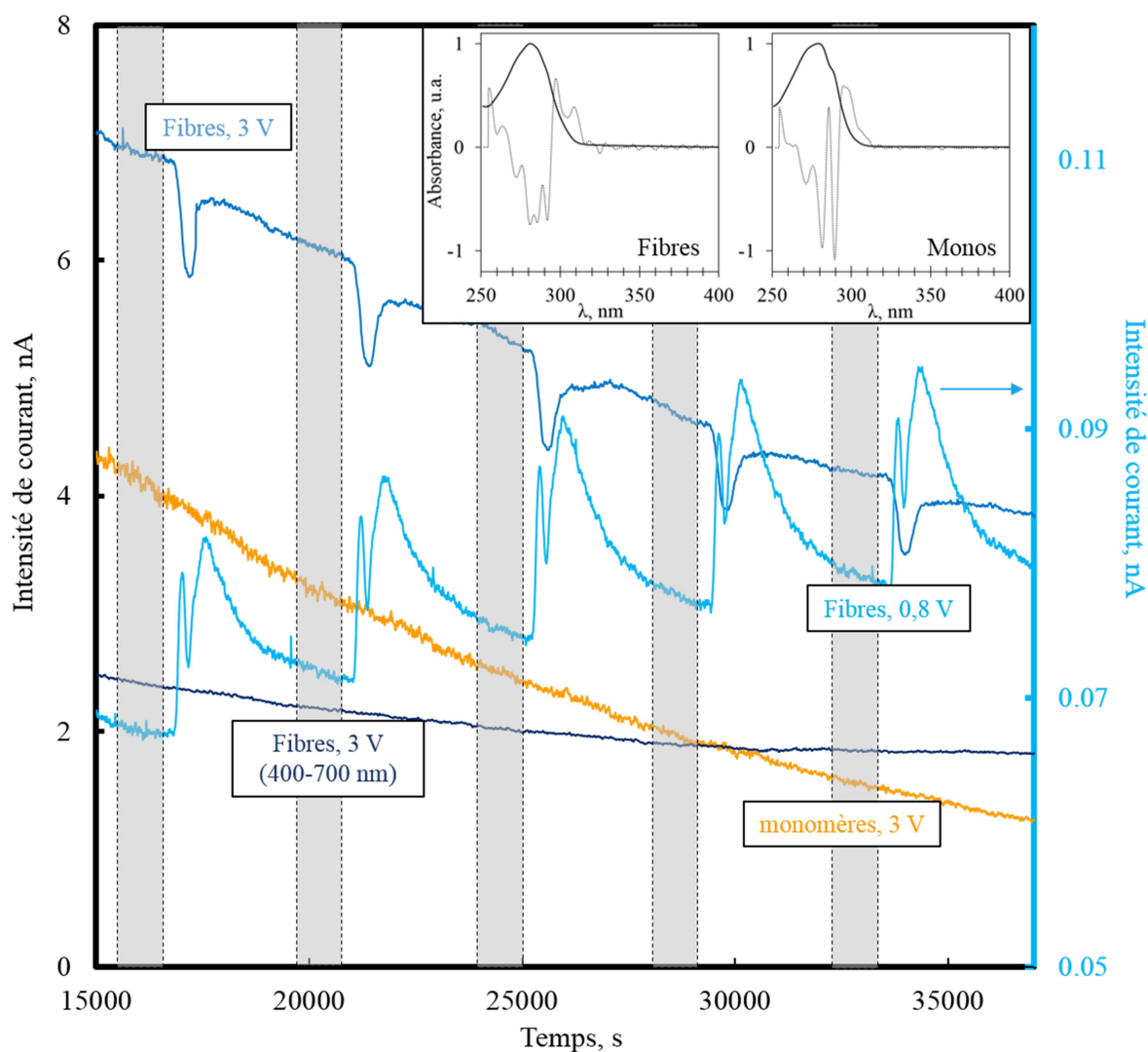


Figure C.28 : Mesure $I-t$ pour un film de fibres HET (courbes bleues) et pour un film de monomères (courbe orange). Les périodes d'illumination (balayage en longueurs d'onde de 200 à 700 nm à $10 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, sauf précision contraire) sont sur fond blanc et périodes sans illumination sur fond gris. Encart : spectres d'absorption des fibres et monomères HET entre 250 et 400 nm (courbe noire) et leur dérivée seconde (courbe grise).

Les enregistrements obtenus avec les échantillons de fibres sont traités de la façon suivante. Les courbes $I-t$ sont découpées par séquences et une moyenne est calculée. Une séquence correspond à 20 minutes dans le noir, suivie des 50 minutes d'illumination et enfin de nouveau de 20 minutes dans le noir. Ensuite le courant moyen, correspondant à un point sur la **Figure C.29**, est calculé pour chaque pallier de longueur d'onde d'éclairement (soit 1 minute). Enfin, la ligne de base est soustraite et les variations de courant exprimées en pourcentage (**Figure C.29**).

Dans les conditions correspondantes au premier régime de conduction des fibres (**Figure C.29 (a)**), le courant augmente brusquement à partir de la longueur d'onde d'illumination de 230 nm. Cette hausse atteint un maximum d'environ 20 % à 360 nm, après quoi, le courant retombe progressivement jusqu'à son niveau de base dans le noir. Néanmoins, il est très

probable que le maximum d'augmentation réel soit masqué par un second effet se produisant plus localement autour de la longueur d'onde 280 nm pendant la phase de croissance du courant. En effet une chute brutale de courant d'approximativement 10 % est observée lorsque l'échantillon est illuminé entre 260 et 350 nm, avec un minimum vers 280-290 nm. Un effet très similaire à cette seconde observation se produit lorsque l'expérience est réalisée dans le deuxième régime de conduction des fibres (**Figure C.29 (b)**). Une diminution du courant nette et centrée à 280 nm survient lorsque l'échantillon est irradié entre 220 et *ca.* 350 nm. Le niveau de courant revient ensuite progressivement à son niveau de base. Cette fois-ci, on ne constate pas d'augmentation du courant. Cependant, il n'est pas exclu que les deux effets superposés décrits dans le premier régime se produisent ici aussi, mais que l'effet de diminution de la conductivité sous illumination à 280 nm soit beaucoup plus important et masque totalement le premier.

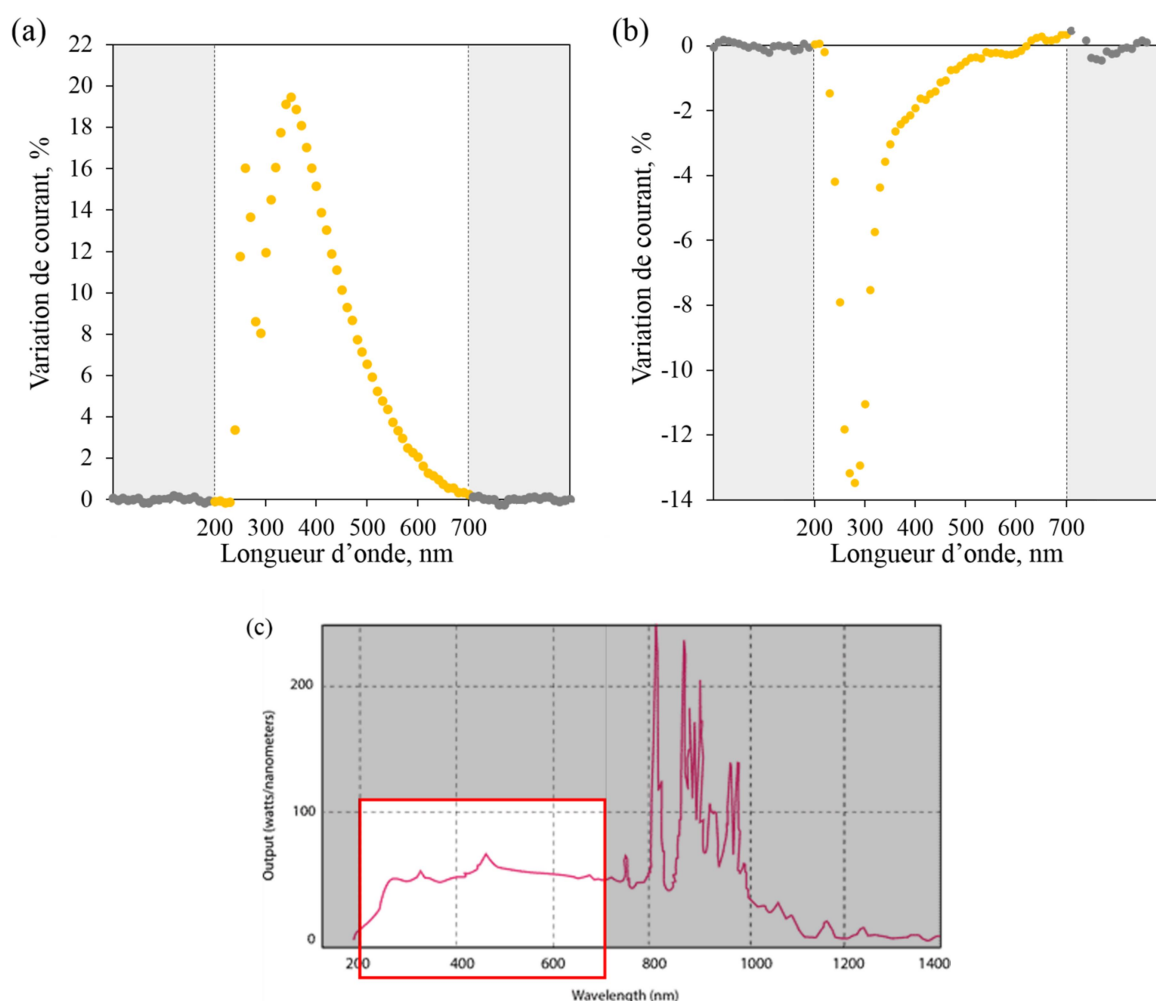


Figure C.29 : variation moyenne du courant en fonction de la longueur d'onde d'illumination des films de fibres amyloïde HET, (a) dans le premier régime et (b) dans le second régime de conduction. Ces courbes ont été construites à partir du graphe *I-t* de la **Figure C.28**. (c) Spectre typique d'une lampe xénon. La gamme spectrale utilisée (200-700 nm) est encadrée en rouge.

Précisons que ces spectres n'ont pas été corrigés par rapport au fait que l'intensité d'illumination de la lampe au xénon n'est pas constante sur tout le spectre balayé. Son

intensité est notamment plus faible dans le domaine proche UV lointain (*ca.* 200 à 250 nm) puis stable pour les longueurs d'ondes supérieures à 250nm sur toute la gamme étudiée (**Figure C.29 (c)**). En prenant en compte cette donnée, les effets corrigés devraient assez similaires des effets observés. Il est cependant possible que le photo-courant positif observé dans le régime I entre 200 et 400 nm soit plus important pour les plus faibles longueurs d'onde (entre *ca.* 200 et 250 nm) avec la correction. En revanche cela ne devrait pas induire de changement pour le "photo-courant négatif" observé dans les deux régimes de conduction.

III.1.2. Effet de la longueur d'onde 280 nm

Ces premières expériences ont montré que la conductivité des films de fibres amyloïdes HET est affectée par l'irradiation de l'échantillon à des longueurs d'onde relevant du proche-UV de manière différente dans le premier et dans le deuxième régime de conduction. A "la lumière" de ces remarquables premiers résultats, nous avons choisi de poursuivre ces investigations sur la conductivité des fibres à l'aide de diodes électroluminescentes (LED) de différentes longueurs d'onde :

- $\lambda = 280$ nm (M280L3, Thorlabs, largeur à mi-hauteur de son spectre d'absorption de *ca.* 12 nm), longueur d'onde pour laquelle l'effet de diminution du courant, observé dans les deux régimes de conduction, est maximal. Elle correspond également à la longueur d'onde de maximum d'absorption du tryptophane, acide aminé possédant de loin le plus fort pouvoir d'absorption de la lumière. On se focalisera donc particulièrement sur cette longueur d'onde.
- $\lambda = 530$ nm (M530L3, Thorlabs, largeur à mi-hauteur de son spectre d'absorption de *ca.* 33 nm), longueur d'onde n'ayant pas d'incidence sur la conductivité des fibres d'après cette expérience et qui sera utilisée comme contrôle.

Les LEDs sont disposée à une distance de 1,5 cm de la surface des échantillons et orientée perpendiculairement à cette dernière. De cette manière, la totalité du dispositif portant les échantillons est illuminé. Les diodes sont pilotées par un régulateur de puissance (DC2200 High-Power LED controller, Thorlabs). Sauf indication contraire, la puissance d'irradiation utilisée est de $130 \mu\text{W.cm}^{-2}$.

III.1.2. i) Caractéristique I-V

Une courbe *I-V* est acquise alors que les échantillons sont éclairés à une longueur d'onde de 280 nm par intermittence correspondant aux segments de DDPs (tension de polarisation) suivants : 0,4–0,6 V ; 0,8–1 V ; 1,2–1,4 V ; 1,6–1,8 V ; 2–2,2 V et 2,4–2,6 V. Cette expérience a été réalisée "en parallèle" pour un film de fibres et un film de monomères. Des effets nets sont observés sur la caractéristique des fibres lorsque l'échantillon est illuminé tandis que, là encore, aucune incidence sur la conductivité du film de monomères n'est détectée (**Figure C.30**). Jusqu'à une DDP d'environ 1,3 V, à chaque séquence d'illumination un décalage positif d'environ 0,1 % de courant est noté. A plus haut potentiel, l'irradiation de

l'échantillon provoque cette fois une diminution du courant, identifiable par l'apparition d'un décalage négatif, également d'environ 0,1 %, sur la caractéristique. Ces effets sont quasi-immédiats dès l'allumage de la diode et prennent fin tout aussi rapidement lorsque l'on éteint la diode. Ces données sont en accord avec les résultats de l'expérience précédente où une augmentation du courant était observée dans le premier régime de conduction et une diminution dans le second régime lorsque les échantillons de fibres étaient illuminés à 280nm (*vide supra*).

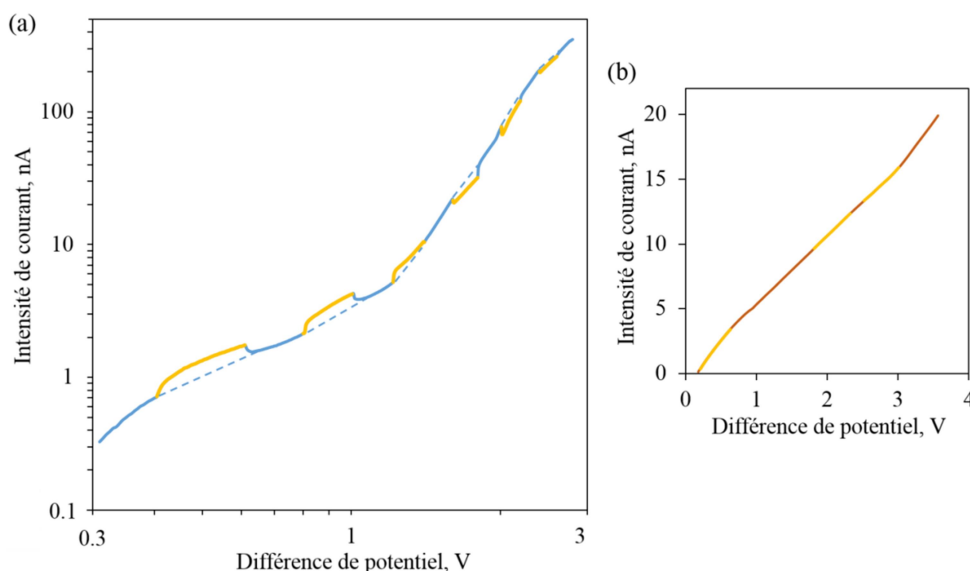


Figure C.30 : Effet de la lumière à 280 nm sur la caractéristique $I-V$ (a) des fibres HET et (b) des monomères HET. Les courbes sont marquées en jaune lors des périodes d'exposition à la lumière.

III.1.2. ii) Mesures $I-t$

Une dernière expérience vient également corroborer les phénomènes observés jusqu'ici. La DDP est fixée à une valeur correspondant au premier ou deuxième régime de conduction des fibres et le courant est enregistré en fonction du temps. De la même manière que précédemment, les échantillons sont irradiés épisodiquement pendant des périodes de 20 secondes et plus. Une fois de plus, une hausse ou une baisse rapide de la conductivité des échantillons de fibres HET est constatée sous illumination, respectivement dans le premier ou le deuxième régime de conduction, jusqu'à atteindre un plateau au bout d'environ 4-5 secondes d'illumination (**Figure C.31(a)**). Après arrêt de l'illumination, le courant retrouve son niveau de base avec une constante de temps similaire (environ 4-5 secondes). Ces phénomènes se répètent à l'identique à chaque séquence d'irradiation. Dans le cas des films de monomères, on observe ici une diminution du courant lorsque l'on éclaire le film (**Figure C.31 (c)**). Cependant, cet effet est différent de celui observé avec les fibres. En effet, cette diminution s'accroît tout au long de la phase d'irradiation et n'est pas réversible, l'intensité de courant ne retrouvant pas son niveau de base après arrêt de la source lumineuse. Ceci est plutôt dû à une détérioration (*i.e.* des dégradations (photo)chimiques sous irradiation dans le proche UV) de l'échantillon par la longueur d'onde utilisée et/ou à la perte d'eau par échauffement. Enfin, l'expérience est répétée avec le même film de fibres mais la longueur d'onde d'irradiation est changée pour 530 nm, tout en conservant la même puissance

d'irradiation. Cette fois, on ne constate pas d'impact sur l'intensité de courant enregistré ni dans le premier ni le deuxième régime de conduction (**Figure C.31 (b)**).

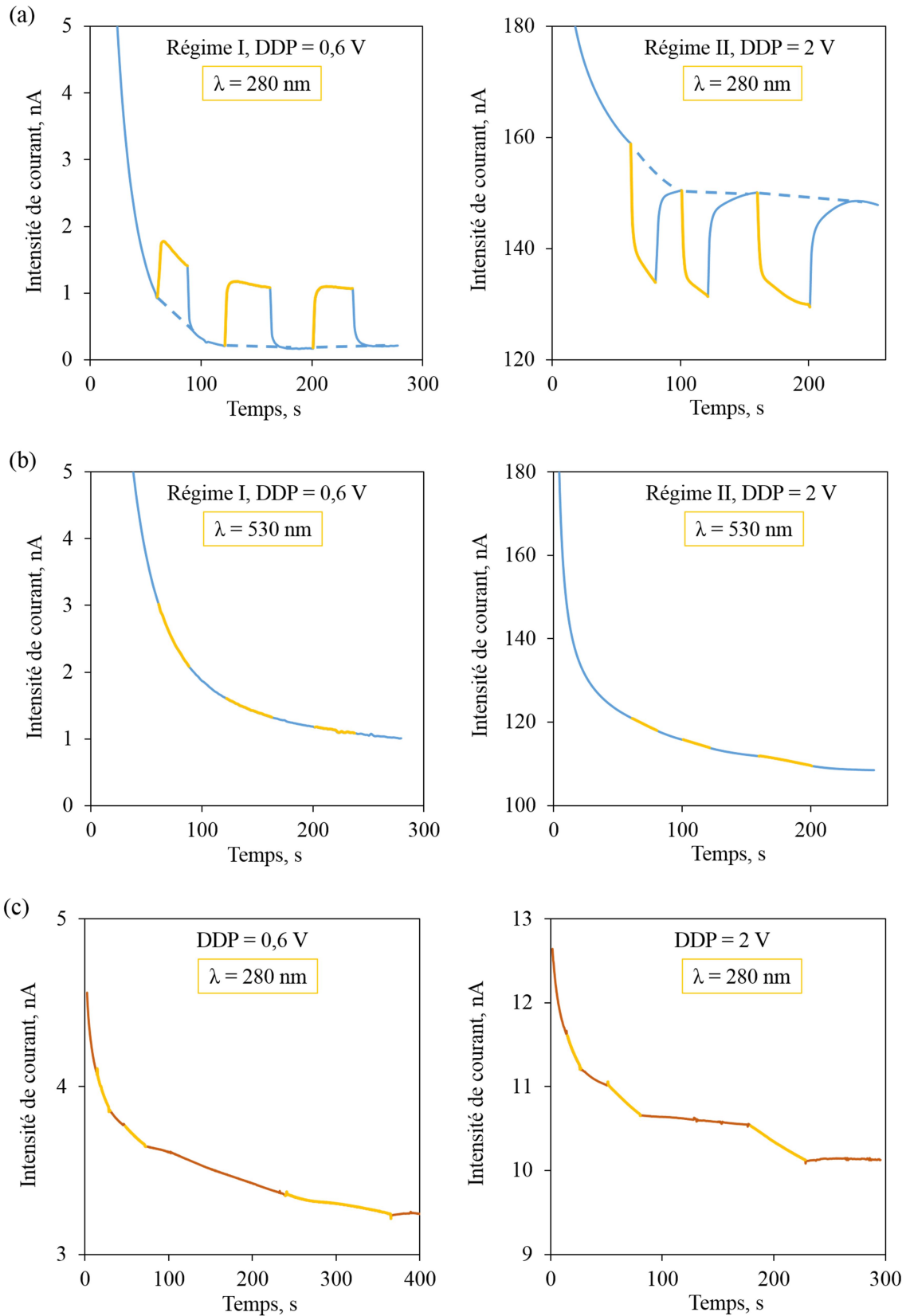


Figure C.31 : Effet de la lumière sur la conductivité des fibres (a) $\lambda = 280 \text{ nm}$, (b) $\lambda = 530 \text{ nm}$, et (c) des monomères HET avec $\lambda = 280 \text{ nm}$, dans les deux régimes de conduction des fibres. Les courbes

sont marquées en jaune lors des périodes d'exposition à la lumière.

Ces résultats corroborent la première expérience décrite (III.1.1.). Il est possible de moduler la conductivité des films de fibres HET en irradiant l'échantillon avec des longueurs d'ondes spécifiques du proche UV. En utilisant la longueur d'onde 280 nm, une augmentation globale du courant est provoquée dans le premier régime de conduction et une diminution dans le second.

III.1.3. Etat de l'art sur la photo-injection de porteurs de charge

La modulation de la conductivité des matériaux semi-conducteurs électroniques par la lumière est une propriété notoire et bien documentée. Dans les photoconducteurs traditionnels, l'irradiation lumineuse provoque la génération de porteurs de charges mobiles ce qui induit une augmentation de la conductivité. Plusieurs études décrivent la génération de photo-courants (positifs) dans des matériaux biologiques (semi-)conducteurs électroniques. Dans ces matériaux, fonctionnalisés ou non, le transfert d'électron sur de longues distances est autorisé par la présence de molécules redox comme des cytochromes¹⁷⁵ ou, le plus souvent, grâce à un système π -délocalisé entre composés aromatiques liés par des interactions de type Van der Waals (π -stacking). Ainsi, les chromophores^{86,176} (mélanine, indigo, etc...) sont particulièrement connus pour leur responsabilité dans la génération de photo-courant. Ce phénomène a également été reporté pour l'ADN dont les bases azotées sont stabilisées grâce à ce type d'interactions¹⁷⁷. Concernant les fibres amyloïdes, les seuls exemples de production d'un photo-courant sont avec des fibres fonctionnalisées, notamment avec des pigments, les fibres jouant seulement le rôle de support pour optimiser l'alignement de ces derniers¹³⁰.

En revanche, dans le cas des (semi-)conducteurs organiques ou biologiques exclusivement protoniques, très peu d'étude relatent d'effet photo-électrique. La seule étude se rapprochant de notre cas de figure dont nous ayons connaissance est celle de Haghighat S. *et al*¹⁷⁸. Ces auteurs ont en effet réussi à photo-générer des protons mobiles dans un polymère semi-conducteur protonique dopé avec un photo-acide, de façon analogue à la photo-génération d'électrons/trous dans les semi-conducteurs électroniques conventionnels. Pendant la durée d'excitation de ce photo-acide (longueur d'onde d'excitation 405nm), la modification de la densité de charge électronique provoque l'affaiblissement de la liaison du proton initialement lié à la molécule. Ce proton peut alors être capté dans le réseau de liaison-H environnant pour participer à la conduction. Les auteurs soulignent notablement que ce mécanisme est particulièrement efficace lorsque le polymère est solubilisé dans de l'eau grâce à l'excellente diffusion des protons en milieu aqueux. Ainsi, il est possible d'envisager qu'un phénomène similaire puisse se produire avec les acides-aminés aromatiques de notre protéine pouvant être excités aux longueurs d'onde du proche UV étudiées.

Enfin, l'effet ressemblant à un "photo-courant inverse" (diminution réversible de la conductivité sous illumination) tel qu'observé ici est plus inhabituel. A notre connaissance, seules quelques publications assez récentes (depuis 2010) décrivent un phénomène semblable, là encore dans le cas de matériaux semi-conducteurs électroniques uniquement

(nanoparticules métalliques^{179,180}, des nanotubes semiconducteurs^{181,182}, dans certains semi-conducteurs présentant des états dégénérés¹⁸³ etc...). Dans ces exemples, le photo-courant inverse est expliqué par le piégeage, la diffusion ou encore la recombinaison des charges photo-injectées. On peut également citer le cas d'un hydrogel composé de fibres en protéines de soie isolantes (protéines de vers à soie) dopé par des nanoparticules d'or responsables de la conductivité du matériau¹⁸⁴. Le mécanisme proposé pour expliquer le photo-courant négatif observé dans celui-ci est que des électrons libres seraient créés par photo-ionisation (lumière UV à 325nm) des protéines puis piégés par les nanoparticules d'or. Cette "perte d'électrons" provoque la diminution de la conductivité de l'échantillon. En l'absence des nanoparticules, cet effet n'est pas observé.

Les résultats présentés ici montrant deux effets photo-électriques simultanés pour un même échantillon biologique conducteur *a priori* uniquement protonique sont donc assez originaux. Il est possible que les résidus aromatiques de la protéine soient impliqués dans ces phénomènes puisque ceux-ci se produisent typiquement à des longueurs d'ondes pouvant être absorbées par ces acides aminés. De plus, les échantillons ne contiennent pas d'autre élément capable d'absorber la lumière aux longueurs d'ondes étudiées.

III.1.4. Dépendances en fonction de la puissance d'illumination

Dans le but d'analyser un peu plus finement les effets sur la conductivité des échantillons de fibres provoqués par l'exposition de ces derniers à la longueur d'onde 280 nm, une dépendance de la variation du courant en fonction de l'intensité d'irradiation a été réalisée (**Figure C.32**). Le courant est enregistré en fonction du temps et l'échantillon est soumis à des créneaux d'éclairage d'environ 30 secondes espacés de périodes de 30 à 40 secondes dans le noir. La puissance d'illumination de la diode est progressivement augmentée entre 18 et 130 $\mu\text{W.cm}^{-2}$.

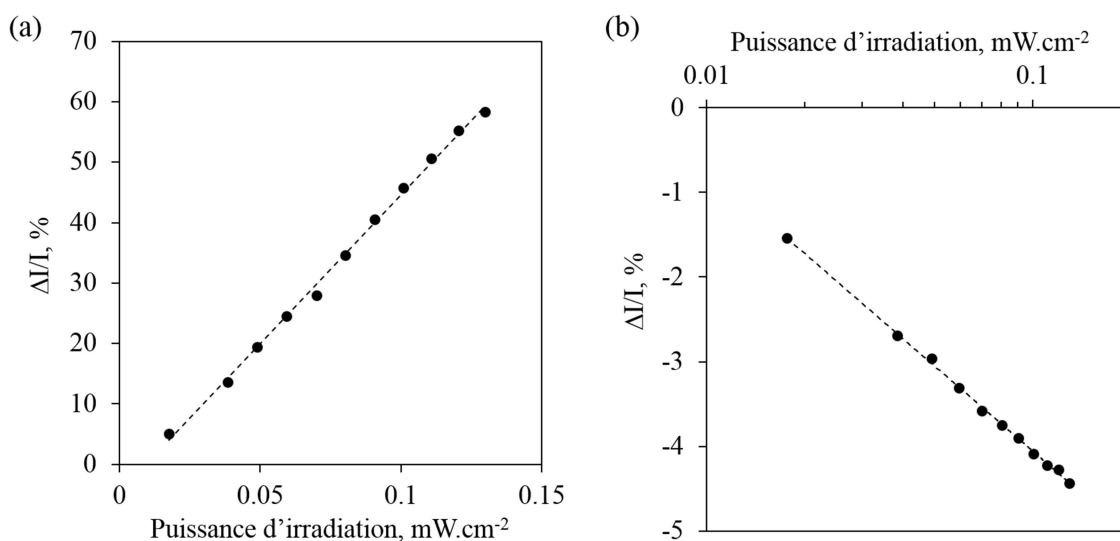


Figure C.32 : Variations de courant enregistrées lors de l'illumination avec $\lambda = 280\text{nm}$ d'un film de

fibres HET en fonction de la puissance d'irradiation, (a) dans le premier régime de conduction ($V = 0,8V$) et (b) dans le deuxième régime ($V = 2,0V$).

Cette expérience est effectuée dans les deux régimes de conduction. Dans les deux cas l'augmentation de la puissance d'irradiation amplifie ces phénomènes mais dans des proportions différentes. Dans le premier régime, l'amplitude d'augmentation du courant sous illumination croît linéairement avec la puissance de la diode. Cela ressemble à un phénomène de photo-injection de charge: le photo-courant généré est proportionnel à la puissance d'irradiation de l'échantillon. Ceci signifie que des protons sont générés par l'irradiation de l'échantillon à 280nm et participent à la conduction.

En revanche, dans le deuxième régime, cette dépendance n'est pas linéaire mais suit plutôt une loi logarithmique suivant la puissance. Une fois encore, cet effet ne se rapporte à aucun phénomène connu. On note également que les variations de courant sont plus importantes environ d'un facteur 10 dans le premier régime. Ces dépendances ont été reproduites pour deux échantillons de fibres différents.

III.2. Effet de l'oxygène et effet de la lumière

Les deux types d'expériences décrits précédemment (mesures $I-t$ et dépendance selon la puissance d'illumination) ont été répétés en absence d'oxygène sur des échantillons de fibres et de monomères. Les conditions d'anoxie ($O_2 < 1 \%$) sont établies de la même manière que décrit au paragraphe I.3.1 de ce chapitre. Seul l'effet de l'illumination à 280 nm a été considéré et ce, dans les deux régimes de conduction. Le décalage du potentiel de transition entre les régimes I et II par rapport aux conditions où l'oxygène est présent dans l'atmosphère (**Figure C.10**) est évidemment pris en compte pour la détermination d'une DDP correspondant au deuxième régime de conduction en absence d'oxygène.

Pour les fibres, l'augmentation de courant dans le premier régime de conduction est toujours détectée. Par contre, ce n'est plus une diminution mais, cette fois-ci, une augmentation du courant qui est observée dans le deuxième régime (**Figure C.33 (b)**). De plus, en ramenant ensuite l'échantillon dans les conditions ambiantes (*i.e.* air ambiant), l'échantillon retrouve le comportement habituellement observé (**Figure C.33 (c)**). Enfin, les dépendances en fonction de la puissance d'illumination montrent une variation linéaire typique d'un phénomène de photo-injection de charge dans les deux régimes de conduction (**Figure C.34**). De plus, comme ce qui a été remarqué en présence d'oxygène, les variations de courant sont environ 10 fois plus importantes dans le premier régime. Concernant les monomères, on observe la même réponse que précédemment (**Figure C.31**) quelles que soient les conditions (données non montrées).

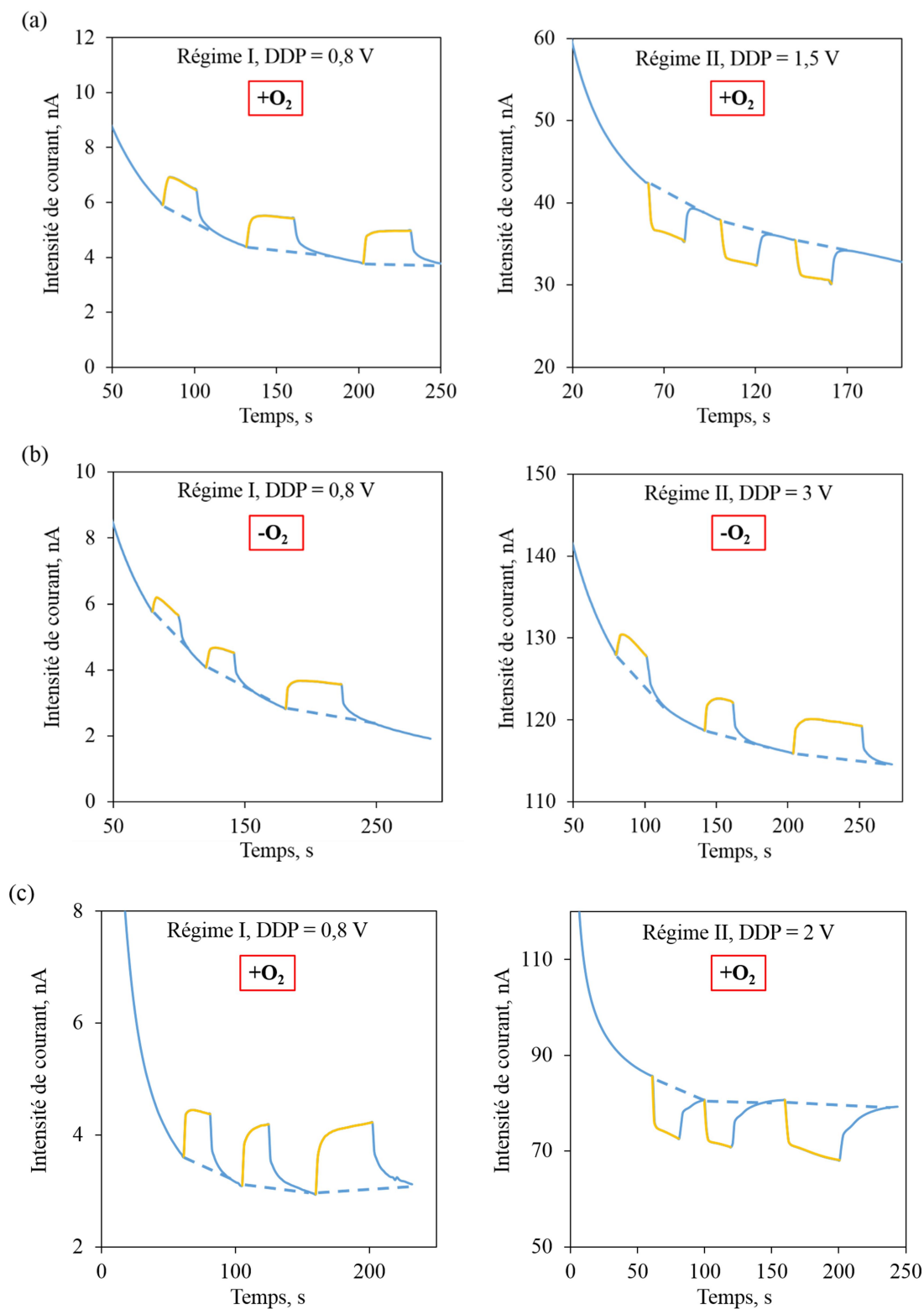


Figure C.33 : Effet de la lumière $\lambda = 280\text{nm}$ sur la conductivité d'un film de fibres (a) en présence d'oxygène ($\text{O}_2 = 21\%$), puis (b) en absence d'oxygène ($\text{O}_2 < 1\%$), et enfin (c) de nouveau en présence d'oxygène ($\text{O}_2 = 21\%$). Les courbes sont marquées en jaune lors des périodes d'exposition à la lumière.

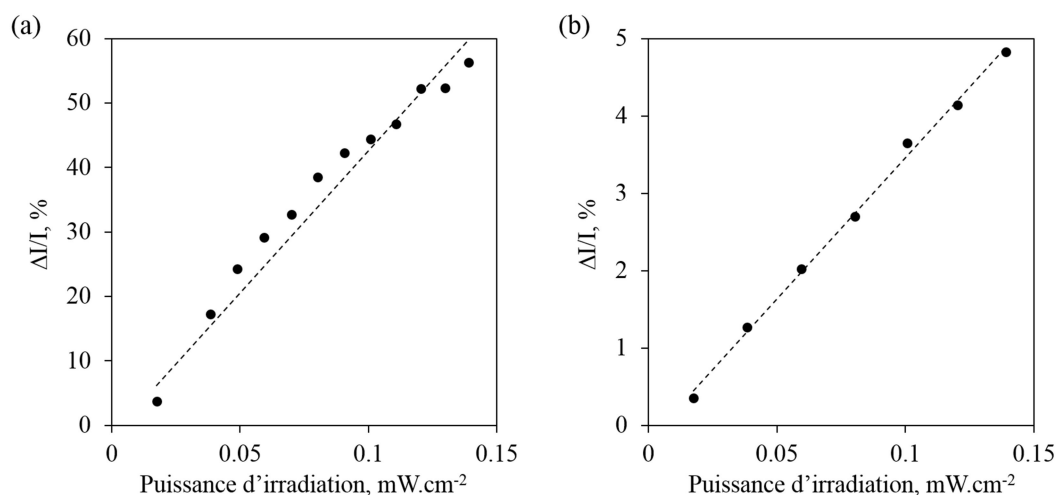


Figure C.34 : Variations de courant enregistrées en absence d'oxygène lors de l'illumination, $\lambda = 280\text{nm}$, d'un film de fibres HET en fonction de la puissance d'irradiation, (a) dans le premier régime de conduction ($V = 0,8V$) et (b) dans le deuxième régime ($V = 2V$).

Cette expérience montre que l'effet de diminution de la conductivité causé par l'irradiation de l'échantillon à 280 nm est en plus lié à une réaction impliquant l'oxygène. Il semble également probable que l'effet de la lumière dans le deuxième régime de conduction résulte en réalité de la superposition de deux effets, de la même manière que dans le premier régime : un effet provoquant l'augmentation de la conductivité par l'irradiation de l'échantillon entre 200 et 400nm et un effet provoquant une diminution de la conductivité sous irradiation à 280nm.

Dans le deuxième régime et en présence d'oxygène, l'effet de diminution prédominerait sur l'augmentation. En absence d'oxygène, l'effet de diminution ne se produisant plus, seul l'effet d'augmentation de la conductivité indépendant de la présence d'oxygène est visible. Une expérience pouvant confirmer ceci consisterait à répéter l'expérience présentée au paragraphe III.1.1. de ce chapitre, testant l'effet de la longueur d'onde d'irradiation sur la conductivité, en absence d'oxygène. Dans ces conditions, l'effet de diminution du courant centré sur 280nm devrait disparaître dans les deux régimes de conduction. Cela n'a pu être réalisé pour des raisons pratiques : disposer d'une enceinte dimensionnée de façon à pouvoir à la fois accueillir le spectrofluorimètre et contrôler facilement le gaz et l'humidité de l'atmosphère.

III.3. Rôle des résidus aromatiques

Dans le but de vérifier si les résidus aromatiques sont impliqués dans les phénomènes de modulation de la conductivité des fibres par l'irradiation des échantillons avec des longueurs d'onde dans le proche-UV, nous avons voulu tester des échantillons de fibres amyloïdes ne contenant pas de résidus aromatiques. Pour être dans des conditions proches de notre cas d'étude, l'idéal est de réaliser des mutations au sein de la protéine HET afin de remplacer les acides aminés aromatiques par des non-aromatiques. Cependant, il est établi que les résidus

F286 et W287 sont essentiels à la formation des fibres¹⁵¹, il n'est donc pas possible de les modifier. C'est pourquoi seule la tyrosine Y281 a pu être mutée et d'autres fibres amyloïdes formées par le peptide R2T (NNLAITVA), dénué de résidu aromatiques, ont été étudiées.

III.3.1. La protéine mutée HET-Y281T

Une mutation de la tyrosine Y281 a été réalisée. Celle-ci a été remplacée par une thréonine (T) grâce une méthode de mutagenèse dirigée (travail effectué par E. Chartier-Garcia). On appellera la protéine mutée HET-Y281T. Cette dernière est produite et purifiée de la même manière que HET non modifiée (cf. **Matériels et Méthodes I.1.**). La préparation des films de fibres pour la caractérisation électrique est également identique. La concentration en protéine des échantillons est comprise entre 300 et 600 μM .

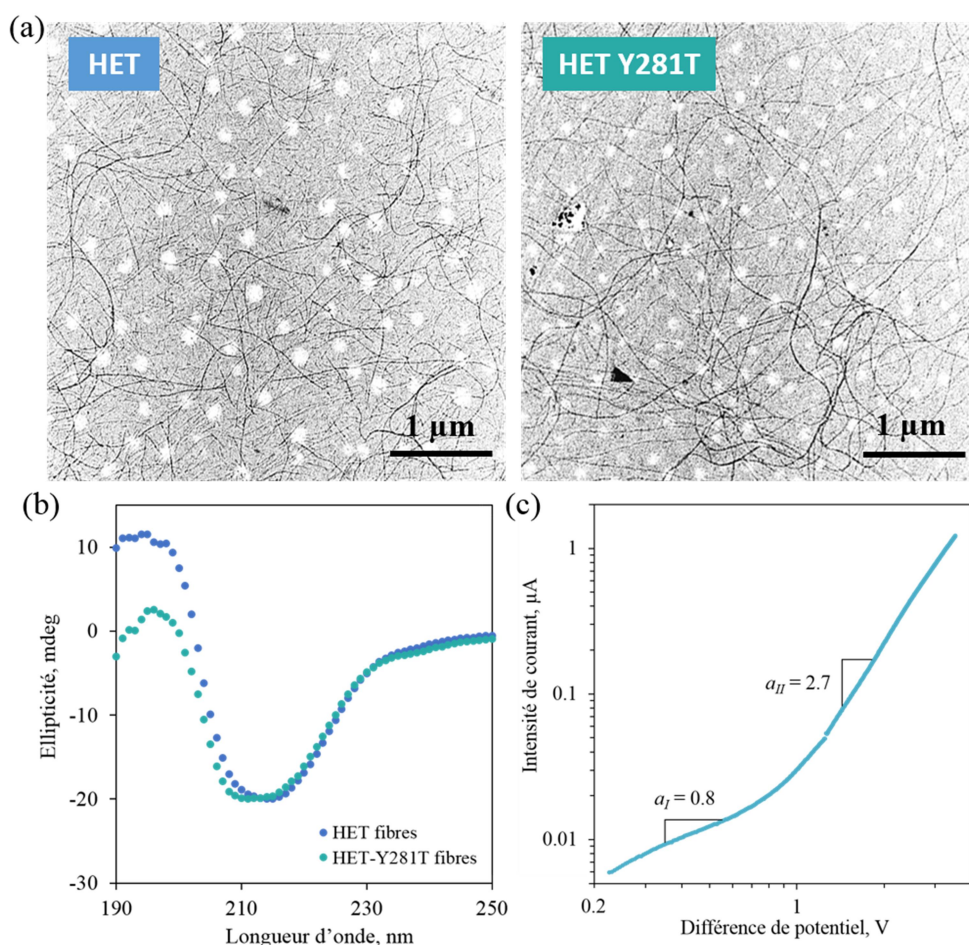


Figure C.35 : (a) Clichés de microscopie électronique en transmission (TEM) de fibres amyloïdes HET (gauche) et HET-Y281T (droite). (b) Spectres de dichroïsme circulaire (CD) des fibres HET (bleu foncé) et HET-Y281T (bleu claire). (c) Caractéristique I - V des fibres HET-Y281T en représentation doublement logarithmique.

La fibrillation de la protéine HET-Y281T est vérifiée par dichroïsme circulaire (CD : circular dichroism) et par microscopie électronique en transmission (TEM : Transmission electron microscopy) à coloration négative puis sa caractéristique I - V est mesurée. Le spectre CD

obtenu avec les fibres HET-Y281T est semblable à celui des fibres HET non mutées et présente un minimum vers 210 nm typique de la structure en feuillets β (**Figure C.35 (b)**). Cela montre que des fibres amyloïdes se sont formées. Ceci est confirmé par imagerie TEM où des fibres sont bien visibles (**Figure C.35 (a)**). Les fibres HET-Y281T paraissent très similaires aux fibres non modifiées. Leur diamètre est comparable à celui des fibres HET (4-6 nm). De plus, comme HET, ces fibres possèdent un haut facteur de forme (typiquement : diamètre/longueur > 1000-2000). Elles mesurent plus de 10 μm . On note cependant un peu plus d'associations de fibres en doublets ou triplets dans le cas des fibres mutantes.

La caractéristique I - V des fibres HET-Y281T est également très similaire à celle des fibres HET avec la présence de deux pentes mises en évidence dans une représentation doublement logarithmique (**Figure C.35 (c)**). Similairement à HET, un premier régime de conduction est défini par la première pente proche de 1 (sur cet exemple 0,8), un deuxième régime par la pente entre 2 et 3 (ici 2,7) ; la transition entre les deux régimes se produisant à un potentiel compris entre 0,7 et 1,0 V. L'effet de la lumière $\lambda = 280$ nm a été étudié comme au paragraphe III.1.2. i) en réalisant une mesure I - V pendant laquelle des périodes d'éclaireage sont opérées entre 0,6 et 0,8 V puis 1,5 et 2,0 V et enfin 2,5 et 3,0 V (**Figure C.36 (a)**). L'effet sur la conductivité de l'échantillon est le même que pour HET. Dans les conditions du premier régime de conduction, une augmentation du courant est observée sous illumination (**Figure C.36 (c)**) et une diminution se produit dans le régime II (**Figure C.36 (b)**). Ce comportement a été corroboré pour trois échantillons différents.

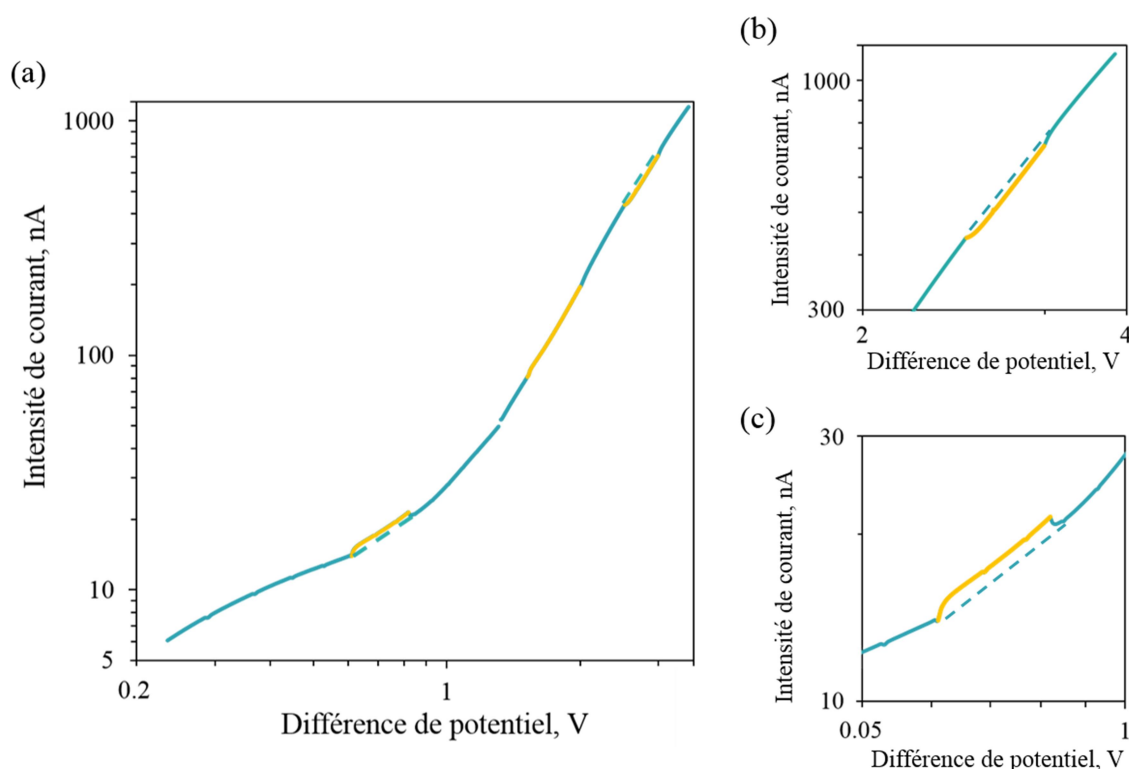


Figure C.36 : Effet de la lumière $\lambda = 280$ nm sur la caractéristique I - V des fibres HET-Y281T. (b) et (c) Zoom de la courbe (a) montrant respectivement l'effet de diminution ou d'augmentation du courant dans le deuxième ou le premier régime de conduction. Les courbes sont marquées en jaune lors des périodes d'exposition à la lumière.

Cette mutation n'a pas changé le comportement électrique des fibres HET. En particulier, les effets de la lumière sur la conductivité des fibres ne semblent donc pas liés à la tyrosine Y281. D'autre part, on peut constater que ce résidu n'est pas essentiel à la fibrillation de la protéine.

III.3.2. Le peptide amyloïde R2T

La séquence d'acides aminés du peptide R2T, NNLAITVA, ne contient pas d'aromatique. Ce peptide est acheté purifié et lyophilisé (ProteoGenix, cat. N°535531). Les fibres R2T sont préparées en diluant directement le stock à raison de 5 mg.mL^{-1} dans de l'eau distillé. Une fois les fibres formées, une goutte de $40 \mu\text{L}$ de cette préparation est ensuite déposée et laissée à sécher entre les électrodes de carbone vitreux. De cette façon, les films contiennent une quantité en protéine similaire à celle des films de fibres HET étudiés jusqu'ici. Dans un premier temps, la caractéristique I - V des échantillons R2T est mesurée.

Bien que la morphologie des fibres R2T soit assez différente de celle des fibres HET (**Figure C.37 (a)**), elles sont notamment beaucoup plus courtes (longueur $< 10 \mu\text{m}$), leur caractéristique électrique I - V est très similaire. De plus, la conductivité est également sensible à l'humidité : une humidité élevée ($\text{HR} > 60 \%$) est nécessaire pour réaliser des mesures correctes.

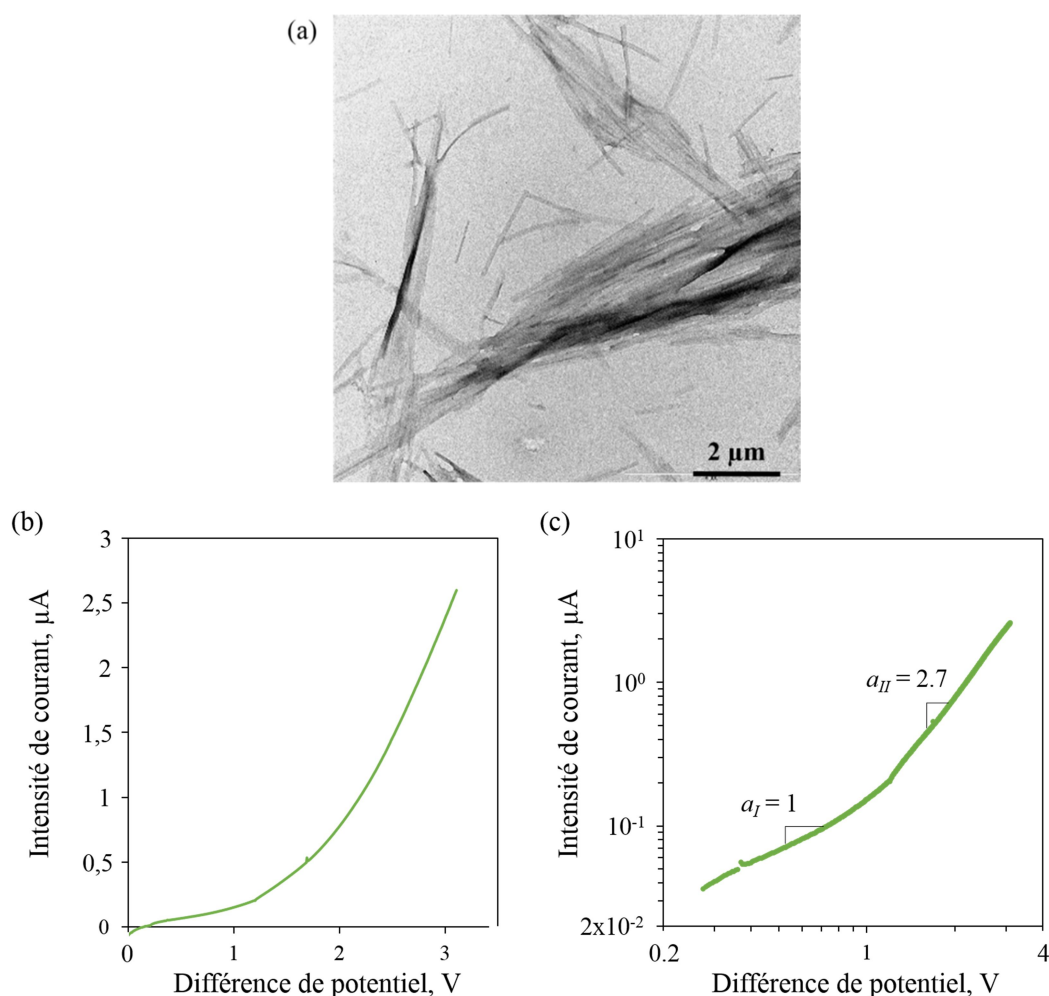


Figure C.37 : Image TEM représentative des fibres amyloïdes R2T (a) et caractéristique I - V des

films R2T représentée dans les repères (b) linéaire et (c) log-log.

La caractéristique I - V des fibres R2T présente également deux régimes de conduction (**Figure C.37 (b) et (c)**). Comme pour HET, la représentation doublement logarithmique de la caractéristique I - V affiche une première pente très proche de 1 pour les DDP les plus faibles, puis une pente supérieure comprise entre 2 et 3 pour les potentiels plus élevés (**Figure C.37(c)**). Néanmoins, la transition entre ces deux régimes semble survenir à un potentiel légèrement plus élevé que pour HET, plutôt entre 1,0 et 1,5 V contre 0,8-1,0 V. Ce comportement est reproductible pour les deux échantillons de fibres R2T testés.

Ensuite, l'effet de la lumière à 280 nm sur la conductivité de ces échantillons a été étudié en présence et en absence d'oxygène. Là encore, les résultats sont reproductibles pour les deux échantillons. On note que la caractéristique I - V en absence d'oxygène montre, un décalage de la transition entre les deux régimes vers les plus hauts potentiels de la même manière que pour HET. Celle-ci se situe alors entre 3 et 3,5 V (donnée non montrée). Ce phénomène est également réversible. L'effet de la lumière a été testé par des mesures I - t de la même manière que décrit au paragraphe **III.1.2. ii)**.

Etonnamment, la conductivité des films de fibres R2T est modulée par l'irradiation des échantillons à 280 nm en dépit du fait que cette protéine ne possède aucun résidu aromatique. En effet, une hausse du courant, jusqu'à l'obtention d'une saturation sous forme d'un plateau, est notée dès lors que les films R2T sont exposés à cette longueur d'onde (**Figure C.38**). A l'arrêt de l'illumination, le courant retombe à son niveau de base. Contrairement aux fibres HET, l'effet est le même dans les deux régimes de conduction en présence comme en absence d'oxygène. On n'observe jamais de diminution du courant. L'augmentation du courant dans le régime II semble moins importante que dans le premier, surtout en présence d'oxygène (+50 % dans le régime I vs +1% dans le régime II). En absence d'oxygène, cette augmentation est de +8 % dans le régime I vs 4.5% dans le régime II. Cependant, il est nécessaire de répéter cette expérience pour confirmer ces proportions. On note que le temps nécessaire pour atteindre le plateau de maximum d'augmentation du courant après l'allumage de la diode ; ou pour redescendre à son niveau de base après extinction de la lumière, paraît plus long que dans le cas des fibres HET mais toujours de l'ordre de grandeur de la seconde (environ 20 secondes contre 5 secondes).

Durant ces expériences, on relève que les mesures de courant en présence d'oxygène sont moins stables qu'en absence d'oxygène, surtout pour des valeurs de tension élevées supérieures à 1V. Cela se produit parfois avec les fibres HET mais dans une moindre mesure. On peut également remarquer pour cette expérience que les niveaux de courants sont plus élevés qu'avec les échantillons de fibres HET, notamment lors de la mesure de l'échantillon en présence d'oxygène (courants de l'ordre du μ A v.s. de l'ordre de la dizaine de nA). Cependant, avec le deuxième échantillon R2T testé, les valeurs de courant enregistrées étaient du même ordre que ceux observés habituellement avec les fibres HET. D'autres échantillons doivent être testés afin de pouvoir déterminer si les fibres R2T sont meilleures conductrices.

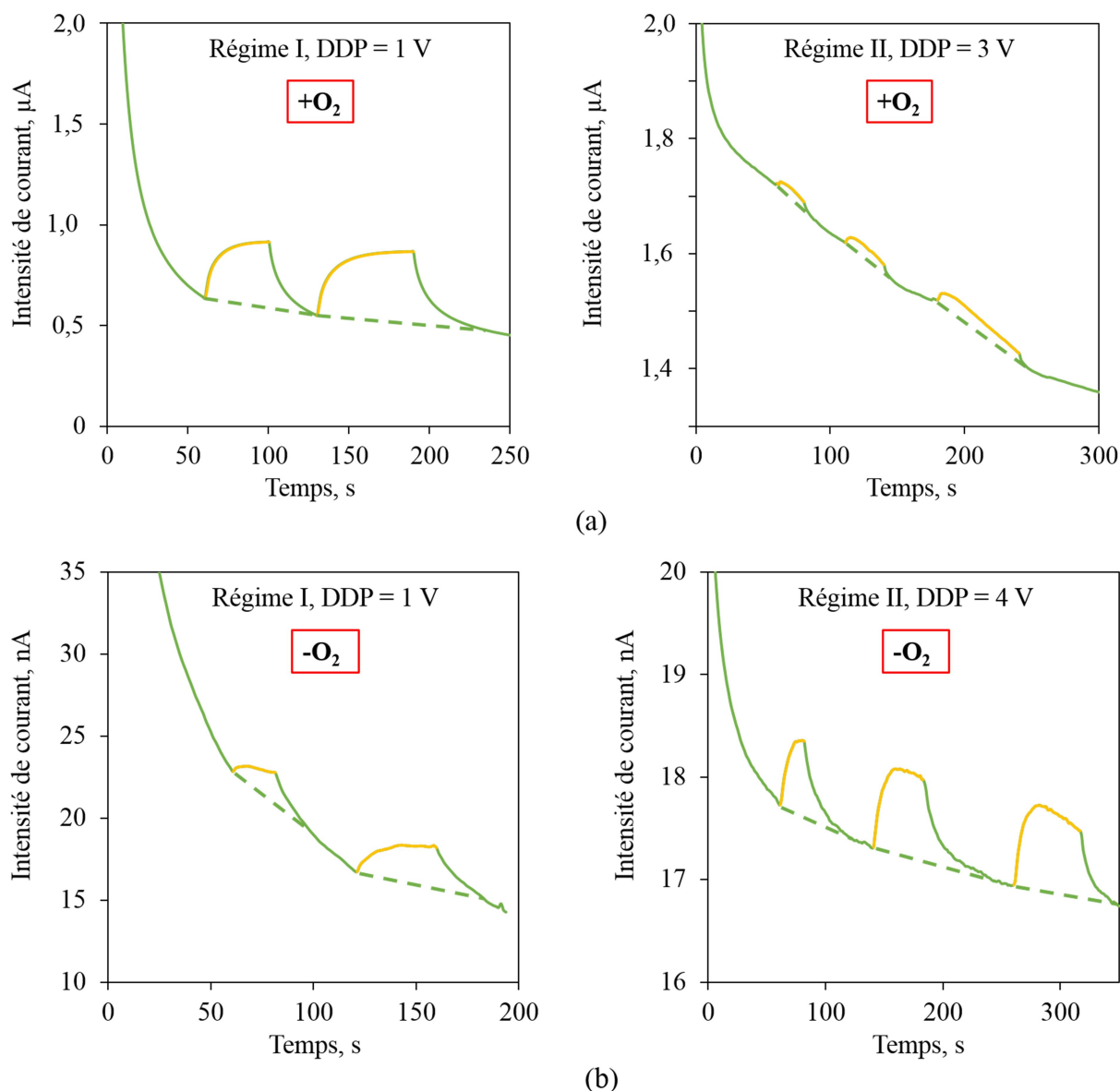


Figure C.38 : Effet de la lumière $\lambda = 280\text{nm}$ sur la conductivité des fibres R2T (a) en présence d'oxygène et (b) en absence d'oxygène, dans les deux régimes de conduction. Les courbes sont marquées en jaune lors des périodes d'exposition à la lumière.

Ces expériences démontrent premièrement une forte similarité entre les comportements électriques des fibres HET et des fibres R2T. Leurs caractéristiques I - V sont très proches et le même effet de l'oxygène est constaté. Nous supposons que le processus de conduction de ces échantillons est similaire à celui des fibres HET, *i.e.* conduction de protons issue de la dissociation de l'eau. Le deuxième résultat important est que la présence de résidus aromatiques n'est pas requise pour générer un photo-courant en illuminant les échantillons de fibres à 280 nm. Cette conclusion s'applique vraisemblablement aux fibres HET aussi. Enfin, il est possible que l'effet de diminution de la lumière observé dans le deuxième régime de conduction avec les fibres HET soit attribuable à la présence de résidus aromatiques. L'implication du tryptophane est particulièrement suspectée puisque celle de la tyrosine est écartée et que la phénylalanine absorbe très peu à 280 nm¹⁸⁵.

III.4. Origine du photo-courant

III.4.1. Effet de la lumière ($\lambda = 280\text{nm}$) sur la conductivité d'une goutte de solution HCl $100\mu\text{M}$

Après ces résultats montrant la photomodulation de la conductivité d'échantillons de fibres pourtant dépourvues de résidus aromatiques, une expérience contrôle a été menée sur une goutte de solution d'HCl $100\mu\text{M}$ (*i.e.* la solution utilisée pour la formation des fibres HET). Une goutte de $40\mu\text{L}$ de cette solution est déposée entre les électrodes de carbone vitreux, sans la laisser sécher. La caractéristique I - V de cet échantillon a déjà été présentée (**Figure C.13**) et présente deux phases similairement à la caractéristiques des fibres. L'origine de la conductivité des échantillons d'HCl $100\mu\text{M}$ liquide ne peut-être que la conduction d'ions issus du sel par diffusion, ainsi que la conduction de protons issus de l'électrolyse de l'eau pour les DDP $> 1,23\text{V}$, probablement via un mécanisme de transport véhiculaire.

Comme précédemment, l'effet de la lumière à $\lambda = 280\text{ nm}$ a été testé dans ces deux régimes en illuminant l'échantillon pendant une mesure I - t . De façon inattendue, une augmentation du courant se produit lorsque l'échantillon est éclairé dans les deux régimes de conduction. L'augmentation est également plus importante dans le premier régime que dans le second (respectivement 20 % contre 4 % d'augmentation). Ce résultat a été vérifié à plusieurs reprises. De plus, le même comportement est observé en absence d'oxygène (données non montrées).

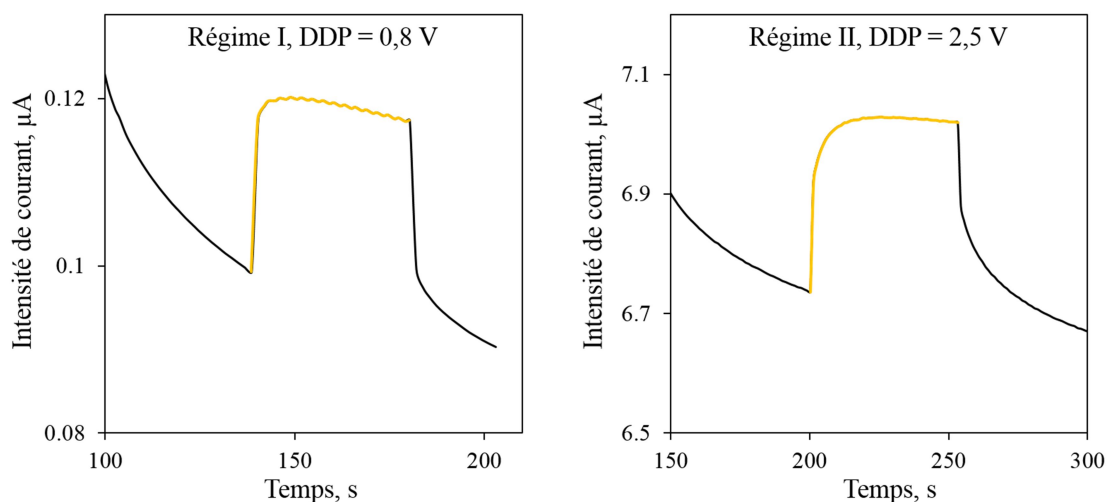


Figure C.39 : Effet de la lumière $\lambda = 280\text{nm}$ sur la conductivité d'une goutte ($40\mu\text{L}$) de tampon HCl $0,1\text{ mM}$ dans les premier et deuxième régimes de conduction (respectivement gauche et droite).

Cette dernière expérience montre que l'augmentation du courant provoquée par l'irradiation des échantillons à des longueurs d'onde de l'UV proche est un phénomène complètement indépendant des fibres. L'oxygène ne semble pas non plus jouer de rôle dans ce phénomène.

III.4.2. Hypothèses sur les mécanismes de génération des photo-courants

Comme mentionné antérieurement dans ce chapitre, très peu d'études se sont intéressées aux effets photo-électriques dans les matériaux semi-conducteurs protoniques, en particulier concernant les matériaux (bio-)organiques. Les effets photoélectriques décrits dans cette étude sont très singuliers. Plusieurs de ces observations étaient assez inattendues, en particulier l'existence de deux phénomènes photo-électriques simultanés et opposés : la génération d'un "photo-courant positif" et d'un "photo-courant négatif"; l'observation justement peu courante d'un "photo-courant négatif"; la non-participation des résidus aromatiques ni même des protéines dans l'effet de photo-injection de charges sous irradiation à 280nm ; ou encore l'implication de l'oxygène sur l'effet de "photo-courant négatif". L'origine de ces effets n'est pas simple à expliquer. Cependant, en tenant compte de l'ensemble de ces résultats, nous proposons les interprétations décrites ci-après.

III.4.2. i) Origine du "photo-courant positif"

Ces expériences ont montré que le mécanisme conduisant à l'augmentation de la conductivité des échantillons, soit à la création de protons, sous irradiation à des longueurs d'ondes du proche-UV n'implique pas les protéines amyloïdes testées. L'hypothèse de photo-injection de protons via des acides aminés pouvant se comporter à la manière d'un photo-acide tel que décrit au paragraphe **III.1.3.** peut donc être abandonnée. De plus, ce phénomène a même lieu avec une simple goutte de solution HCl 100μM dilué dans de l'eau distillée. Cela signifie qu'il s'agit d'une réponse du système électrochimique étudié {électrodes + eau} à l'irradiation à des longueurs d'onde du proche-UV.

Nous avons également songé au processus de photolyse ou photo-ionisation de l'eau engendrant, entre autres, une "paire" $\text{H}_3\text{O}^+/\text{OH}^\bullet$. En effet, théoriquement, l'énergie nécessaire à ce processus est d'au moins 1,23eV donc avec de la lumière aux longueurs d'onde inférieures à 1008nm. Cependant, pour $\lambda > ca. 400\text{nm}$, les photons sont peu énergétiques, la réaction est alors très lente et négligeable. De plus, l'eau est relativement transparente aux longueurs d'ondes étudiées (200-700nm) avec un minimum d'absorption à *ca.* 400nm (**Figure C.40**). C'est pourquoi, la photolyse de l'eau n'est en réalité efficace que pour les longueurs d'onde de l'extrême UV, $\lambda < 190\text{nm}$ ¹⁸⁶. Khusnatdinov N.N. & Petrenko V.F. ont par exemple montré que la photoconductivité observée lors de l'électrolyse de la glace sous irradiation UV ($\lambda < 190\text{nm}$) était d'origine protonique, les protons provenant de la photolyse de l'eau¹⁸⁷.

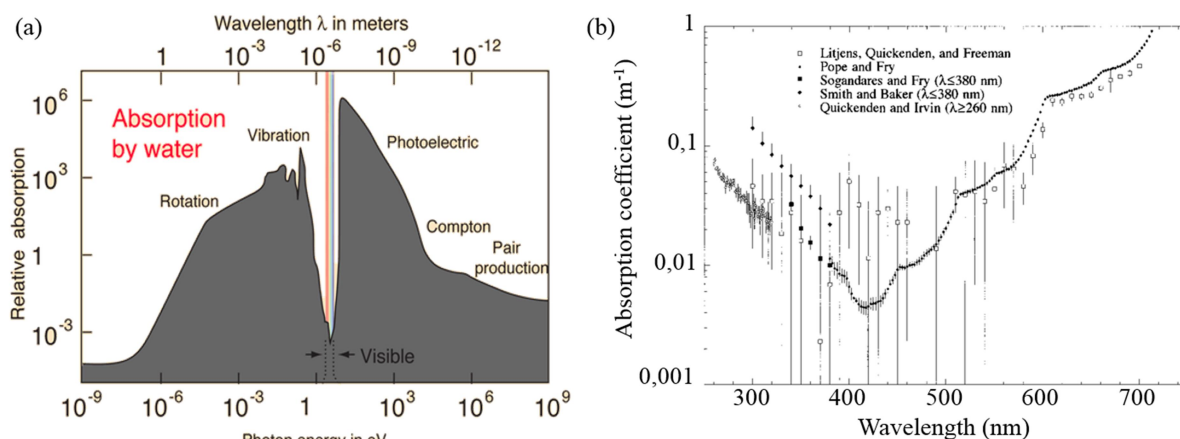


Figure C.40 : Absorption de l'eau liquide dans le spectre électromagnétique (a) et détail du spectre d'absorption de l'eau liquide dans le visible et l'UV proche (b).

Tiré de : <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Chemical/watabs.html> (a) et de Fry E.S.¹⁸⁸ (b).

Une hypothèse plus probable pourrait être la photo-génération de charge via les électrodes de carbone vitreux. Quelques études sur le comportement photo-électrochimique d'électrodes de carbone, et en particulier de carbone vitreux (GC, pour *glassy carbon* en anglais), montrent en effet qu'il est possible de générer un photo-courant grâce à l'irradiation de ce type de matériau à des longueurs d'onde du proche-UV¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Le GC est composé d'un réseau d'atomes de carbone liés covalamment par des liaisons π (orbitales hybridées sp^2) qui peuvent absorber l'énergie des rayonnements de l'UV visible ($\lambda < 400$ nm) par transitions directes $\pi-\pi^*$. Lors de ce phénomène, des paires électrons-trous sont générées respectivement dans les bandes de conduction et de valence du matériau. Sous l'effet d'un champ électrique, ces porteurs de charge sont entraînés aux interfaces électrodes/matériau où ils peuvent réagir avec des espèces chimiques. Cela induit alors des photo-courants au niveau de l'anode ou de la cathode. Un tel phénomène est tout à fait envisageable dans notre système d'étude.

Une expérience, qui sera prochainement réalisée, permettant de montrer le rôle électrodes de carbone dans ce phénomène serait de répéter l'expérience présentée au paragraphe Résultats et Discussions III.1.2. ii) en masquant ces dernières à la lumière. Il serait alors intéressant d'identifier les réactions chimiques à l'origine du photo-courant observé. On note que les électrons et trous photo-générés peuvent réagir avec les molécules d' H_2O en provoquant leur dissociation¹⁹⁰ :

$$\begin{cases} 2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2 + 2OH^- \\ 2H_2O + 4h^- \rightarrow O_2 + 4H^+ \end{cases}$$

Des protons ou des ions hydroxydes pourraient être produits de cette manière et participer à la conduction.

Ce phénomène se produit donc indépendamment du régime de conduction imposé. Enfin, le fait que cet effet n'est pas observé avec les échantillons de monomères HET peut s'expliquer par l'absence de mécanisme de conduction protonique efficace au sein de ces échantillons et ainsi que de l'absence de l'électrolyse de l'eau.

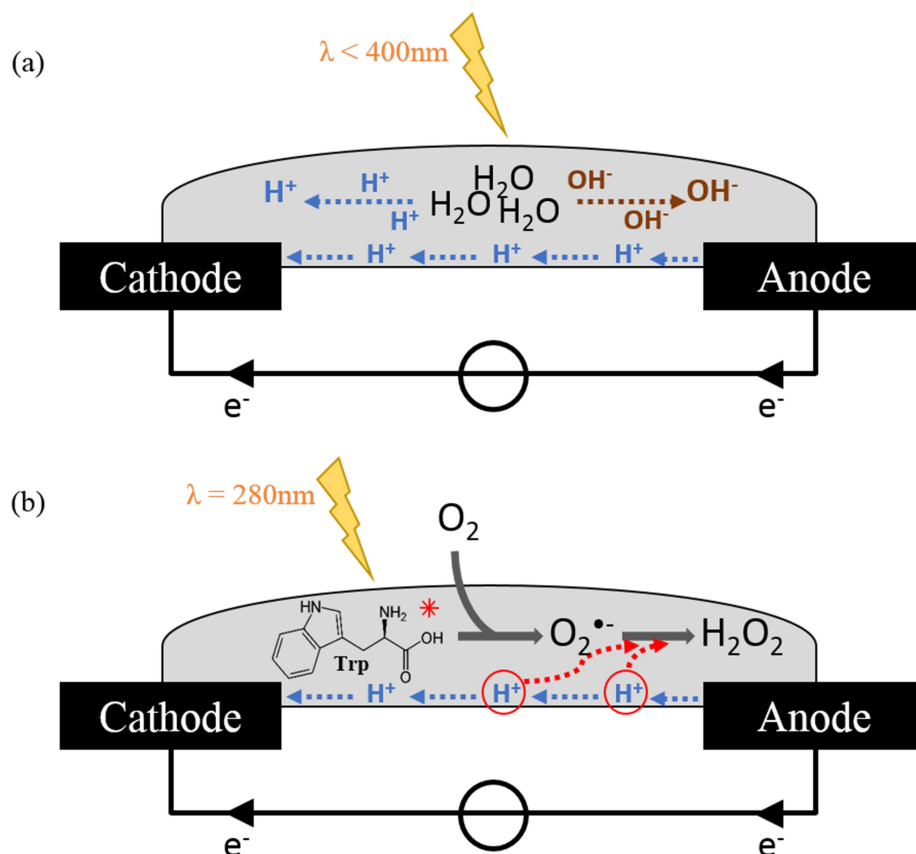


Figure C.41 : Schémas représentant les mécanismes hypothétiquement responsables des variations de courant observés sous illumination des échantillons dans le proche UV : (a) effet d'augmentation du courant et (b) effet de diminution du courant.

III.4.2. ii) Origine du "photo-courant négatif"

Les expériences ont montré que l'effet de diminution du courant sous irradiation spécifiquement à la longueur d'onde 280nm est très certainement provoqué par une réaction impliquant à la fois les tryptophanes et l'oxygène. Nous proposons d'expliquer ce phénomène par une réaction photochimique entre ce résidu aromatique et l'oxygène présent dans l'atmosphère. En effet, le tryptophane est connu pour être particulièrement photoactif. Il s'agit du résidu aromatique ayant, de loin, le plus fort coefficient d'absorption des longueurs d'ondes de la proche UV, avec un maximum à *ca.* 280nm. La photo-oxydation du tryptophane par irradiation dans la proche UV est un phénomène très étudié à cause de la réactivité chimique qui en découle. En particulier, comme nous allons le voir, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont formées en présence d'oxygène, ce qui a de nombreuses répercussions sur les systèmes biologiques.

L'absorption de cette énergie par le tryptophane fait passer cette molécule de son état fondamental (Trp(S₀)) à un état excité singulet (Trp(S₁)). Comme le montre la **Figure C.42**

plusieurs chemins réactionnels sont alors possibles entre l'oxygène et ce tryptophane excité, cherchant à retourner dans un état fondamental stable^{192,193}.

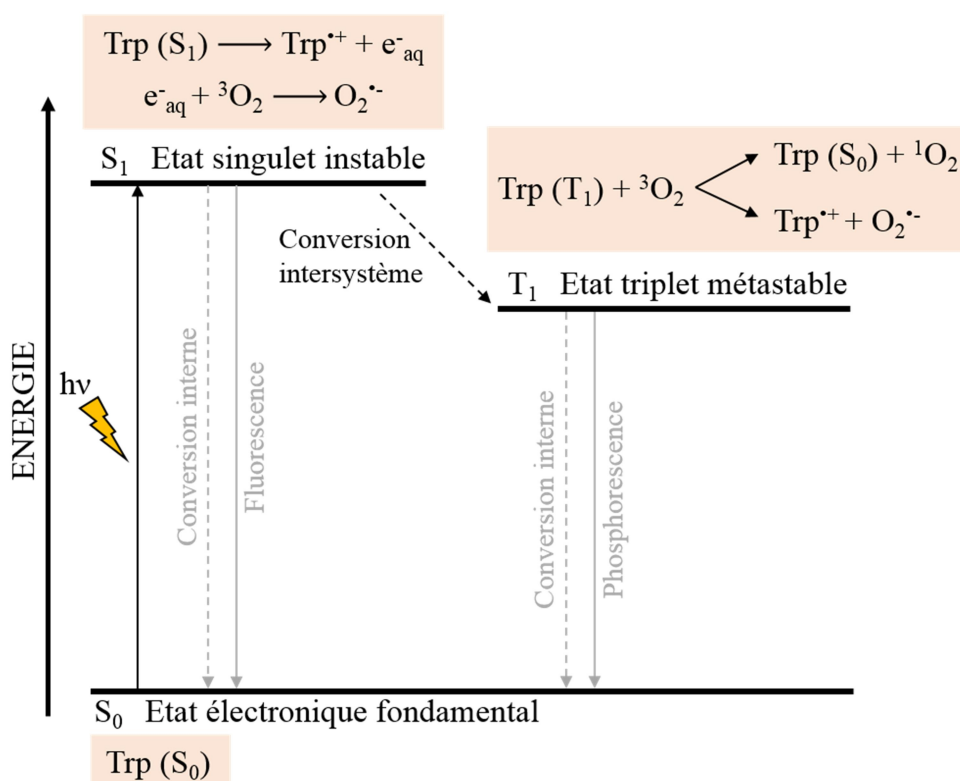


Figure C.42 : Schéma simplifié du diagramme de Jablonski représentant les différents états excités du tryptophane (Trp (S₁) et Trp (T₁)) ainsi que les principaux mécanismes permettant son retour à l'état fondamental (Trp (S₀)). Les réactions possibles entre les différents états excités du tryptophane et l'oxygène moléculaire sont résumées dans les cadres colorés.

Une réaction possible du tryptophane singulet est la photo-ionisation de ce dernier (un électron est photo-éjecté). Ceci produit un cation tryptophane radicalaire (Trp^{•+}) ainsi qu'un électron hydraté (e⁻_{aq}). Il s'agit d'un électron libre pouvant exister en solution (avec un temps de vie très court *ca.* < 1msec). En milieu aqueux, une couche d'hydratation constituée de molécules d'eau est formée autour de l'électron¹⁹⁴. Cet électron très réactif peut notamment être capté par le dioxygène atmosphérique pour former l'ion superoxyde (O₂^{•-}). D'un autre côté, la transition du tryptophane de l'état singulet à un état triplet (Trp(T₁)) peut également survenir par conversion énergétique intersystème. Ici, deux processus réactionnels sont possibles avec le dioxygène. En effet, l'état fondamental de cette molécule est un état triplet (³O₂) également. Un électron peut alors être transféré du tryptophane à l'oxygène produisant comme précédemment un Trp^{•+} ainsi qu'un superoxyde O₂^{•-}. Autrement, un transfert d'énergie peut également s'opérer entre Trp(T₁) et ³O₂ conduisant au retour du tryptophane dans son état fondamental et au passage de l'oxygène dans l'état singulet (¹O₂).

Ainsi, deux mécanismes conduisent à la production d'ions superoxyde. Cette espèce est connue pour être notamment responsable de la formation de peroxyde d'hydrogène en consommant des protons : $2 \text{ O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Nous supposons donc que ce

superoxyde, produit via une photo-réaction entre le tryptophane et l'oxygène, est responsable de la captation de protons dans notre système qui ne peuvent alors plus participer à la conduction (**Figure 41 (b)**). C'est pourquoi une baisse du courant observée lorsque l'on irradie l'échantillon à la longueur d'onde de 280nm. De plus, il est compréhensible que cette baisse de courant soit d'autant plus importante dans le deuxième régime de conduction, régime où l'électrolyse de l'eau a lieu et où la conductivité des échantillons est donc largement gouvernée par la conduction protonique.

III.5. Conclusion

L'étude du comportement photoélectrique des fibres amyloïdes HET a mis en évidence la superposition de deux phénomènes modulant la conductivité des échantillons lorsque ces derniers sont irradiés à des longueurs d'onde du domaine proche UV (200-400nm). Ces deux phénomènes sont antagonistes. Le premier, prédominant dans le premier régime de conduction des fibres ainsi que dans les deux régimes en absence d'oxygène atmosphérique, provoque une augmentation de la conductivité. Nous supposons que des protons sont photo-injectés dans le matériau à la faveur de la photolyse de l'eau contenue dans les films. La photolyse de l'eau est ici possible grâce à l'effet combiné de l'irradiation de l'échantillon dans le proche UV, de la polarisation électrique de ce dernier et de l'existence d'un mécanisme de conduction protonique efficace. Ainsi, ce phénomène peut se produire dans tout milieu conducteur protonique aqueux. Le second mécanisme, prépondérant dans le deuxième régime de conduction, se produit en présence d'oxygène et conduit à une diminution du courant. Ce phénomène est également plus spécifique de la longueur d'onde 280nm et résulte très certainement de la photo-excitation du tryptophane, résidu absorbant cette longueur d'onde. Nous proposons que des espèces réactives à l'oxygène (ROS), en particulier des ions superoxydes, soient créés par réaction entre les tryptophanes photo-excités et l'oxygène. Ces espèces réagissent à leur tour, notamment en captant des protons. Ces derniers sont alors soustraits au processus de transport c'est pourquoi une baisse de la conductivité s'ensuit.

Finalement, il est possible de moduler positivement ou négativement la conductivité des films de fibres HET par irradiation à 280nm en jouant sur le taux d'oxygène présent dans l'environnement de l'échantillon. Il est à noter cependant que les ROS (H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, 1O_2) supposément générées en présence d'oxygène lors du deuxième mécanisme sont nocives pour les matériaux biologiques. Dans ce cas, une dégradation des échantillons est à craindre.

Conclusion Générale, Perspectives

Conclusion générale

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier le processus de transport de charges dans les fibres amyloïdes HET, la seule protéine dont la structure atomique a été résolue sous la forme de fibres amyloïde par RMN du solide. Les propriétés conductrices de ces fibres ont été étudiées par des méthodes de caractérisation électriques et électrochimiques sous la forme de films "secs" constitués de fibres HET concentrés. L'influence de plusieurs facteurs sur la conductivité de ces échantillons a notamment été examinée: l'humidité et la température environnantes, la présence d'O₂ atmosphérique ainsi que l'irradiation des échantillons à des longueurs d'ondes du proche UV (200-400nm). La comparaison avec des films "secs" de cette même protéine sous la forme monomère a permis de démontrer que l'organisation de la protéine sous la forme de fibres était primordiale pour conférer leur propriété (semi-)conductrice à ces échantillons. Du reste, l'eau joue un rôle particulièrement important dans les processus de conduction dont les fibres sont le siège. Le couplage de ces investigations à des études structurales, prenant notamment en compte le rôle de l'eau dans la structurations des fibres HET à différentes échelles a permis de proposer un mécanisme expliquant la conductivité des fibres HET (*vide infra*).

Les fibres amyloïdes HET, un bioconducteur protonique

Nous proposons que les protons soient les principaux porteurs de charge responsables de la conductivité des films de fibres HET. Deux mécanismes de conduction doivent être pris en compte au sein de ces échantillons: un mécanisme intra-fibre et un mécanisme inter-fibres. Concernant le processus de transport intra fibrillaire, nous proposons que les protons soient transportés selon un mécanisme du type Grotthuss (saut de protons entre deux molécules d'eau voisines par échange de liaison-H) via deux réseaux de molécules d'eau organisés le long des fibres. Ces deux "canaux" d'eau ont été mis en évidence par simulation de dynamique moléculaire d'une fibre de 12 sous-unités HET en présence d'eau. Ils sont vraisemblablement stabilisés par l'établissement de liaisons-H entre les molécules d'eau et les acides aminés chargés et polaires présents à la surface des fibres ainsi qu'entre les molécules d'eau elles-mêmes. Le confinement du mécanisme de conduction dans ces canaux rend la conductivité des fibres insensible au pH environnant. Le mécanisme de transport inter-fibres est plus difficile à appréhender expérimentalement. En l'état de nos investigations, nous supposons qu'il est de la même nature que le précédent (mécanisme de Grotthuss) et médié par l'eau.

Percolation des réseaux d'eau

L'étude des interactions eau-fibres, notamment l'isotherme de sorption des fibres et l'étude de diffusions des neutrons ont montré une forte interaction entre ces deux composants : l'eau s'adsorbe et se désadsorbe facilement des fibres. Toutefois, les résultats de diffusions des neutrons permettent d'affirmer que la structure intrinsèque des fibres n'est pas affectée par l'hydratation. Jusqu'à *c.a.* 65-70% d'HR, ce qui représente *ca.* 50 molécules d'eau par sous-

unité HET, l'eau adsorbée vient principalement remplir les deux canaux d'eau identifiés. Un seuil de percolation est établi à *ca.* 40-50% d'HR (*ca.* 30 H₂O/ sous-unité HET) à partir duquel la densité de molécules d'eau des canaux est suffisante pour permettre la conduction protonique. L'adsorption d'eau supplémentaire améliore cette conduction. Pour les HR supérieures à 70%, l'eau adsorbée par les échantillons n'est pas spécifiquement liée aux fibres et considérée comme de l'eau libre. L'augmentation de cette eau libre autour des fibres les éloigne les unes des autres et rend le transport inter-fibrillaire moins aisé. Ces effets de l'eau sur la conduction des fibres ont été confirmés par l'étude de l'influence de l'adsorption d'eau sur la conductivité des fibres ainsi que par spectroscopie d'impédance électrochimique.

Génération de protons par réactions électrochimiques

Au-dessus du seuil de percolation de l'eau, les échantillons de fibres possèdent une conductivité comparable aux semi-conducteurs à grand gap. De plus ils possèdent alors une caractéristique *I-V* non linéaire présentant une tension de seuil de *ca.* 0,9V à partir de laquelle le courant augmente fortement avec une dépendance en V^α , avec α compris entre 1,5 et 3,0. L'étude de l'impact de l'humidité sur la conductivité des fibres montre que la valeur de α augmente avec l'humidité. Ce courant est considéré comme étant un courant d'oxydoréduction produit par l'électrolyse de l'eau adsorbée dans le film de protéine au niveau de l'anode. La réaction cathodique dépend de la présence d'oxygène moléculaire atmosphérique. Les électrons issus du circuit électrique et les protons transportés dans le film de fibres se recombinaient pour former du H₂ en absence d'oxygène ou bien du H₂O₂ en présence d'oxygène. La tension de polarisation du système nécessaire aux réactions en présence d'oxygène est moins élevée qu'en absence d'oxygène. Une expérience préliminaire a d'ailleurs permis de détecter la formation d'H₂ lorsqu'un film de fibres est polarisé avec une tension supérieure à 1V.

Photo-modulation de la conductivité des fibres

Une attention particulière a été portée à l'effet de la lumière sur la conductivité des films de fibres. En effet, deux effets antagonistes sur la conductivité des fibres se produisent lorsque l'échantillon est irradié à des longueurs d'onde du proche UV (200-400nm) : on observe à la fois la production d'un photo-courant et d'un photo-courant inverse. Ce dernier résulte d'une irradiation plus spécifique de l'échantillon à 280nm et requiert la présence d'oxygène. Il est aussi particulièrement important dans le cas où la tension de polarisation de l'échantillon est supérieure au seuil de la réaction d'hydrolyse, le "photo-courant positif" est alors totalement masqué par ce "photo-courant négatif".

Une série d'expériences sur des fibres HET mutées où la tyrosine a été substituée par un acide-aminé non aromatique (la thréonine), sur un autre type de fibres amyloïde (R2T) totalement dépourvu de résidu aromatique ainsi que sur une goutte liquide de la solution utilisée pour la formation des fibres (HCl 100μM) a permis d'identifier l'origine de ces deux effets photoélectriques. Le premier ("photo-courant positif"), également observé dans le cas

de la goutte d'HCl, serait dû à la photodissociation de l'eau contenue dans les échantillons. Sous l'effet de la DDP imposée à l'échantillon, les protons créés par cette photo-réaction peuvent être immédiatement captés dans le mécanisme de conduction. Le photo-courant inverse est, lui, lié à la présence de tryptophane au sein des fibres ainsi que du dioxygène présent dans l'atmosphère et facilement adsorbé par les matériaux organiques. Nous suggérons qu'une réaction ait lieu entre les tryptophanes excités par absorption de la lumière à 280nm et le dioxygène, ce qui produit en particulier des ions super-oxydes. Ces super-oxydes réagissent alors avec les protons circulants via un canal d'eau à proximité des tryptophanes. Ces protons ne participent donc plus à la conduction, et la conductivité des échantillons baisse.

Perspectives

Nous avons étudié jusqu'ici la conductivité des fibres HET sous la forme de films "sec" concentrés en fibres qui sont déposées aléatoirement sur le substrat. Pour poursuivre l'étude des mécanismes de conduction intrinsèque des fibres et les mécanismes inter-fibres, les prochaines étapes consisteraient à étudier des échantillons de fibres alignées. Ces fibres sont des objets mésoscopiques (longueur *c.a.* 2-10 μm et diamètre: 5 nm) présentant un moment dipolaire qui permet d'envisager leur orientation par cisaillement de leurs dispersions aqueuses ou par application d'un champ magnétique ou électrique alternatif, jusqu'à atteindre ultimement l'échelle de la fibre unique (AFM conducteur). De plus, dans la mesure où les porteurs de charges incriminés sont des protons, il serait intéressant d'étudier l'effet du remplacement isotopique de H_2O par D_2O sur la cinétique de ce processus⁶³, par exemple en utilisant la spectroscopie d'impédance électrochimique⁹¹.

Il est également nécessaire de poursuivre l'étude des réactions électrochimiques pour déterminer les réactions ayant lieu aux électrodes avec plus de certitudes. Ceci passe par une détermination rigoureuse des potentiels électrochimiques et par la poursuite de la recherche des gaz produits pendant la polarisation électrique des films de fibres.

Notons qu'il est possible que les mécanismes de conduction décrits dans cette étude pour les fibres amyloïdes HET soient communs à d'autres fibres amyloïdes, voire génériques aux fibres amyloïdes. Nous avons notamment vu dans cette étude que les fibres R2T avaient des caractéristiques électriques similaires à celle des fibres HET, dont la morphologie est pourtant assez différente. Ceci a également été observé pour d'autres fibres telles que des fibres d' α -lactalbumine et d'A β à l'occasion d'autres travaux de l'équipe non présentés ici. De plus, l'eau est connue pour être importante pour la structure des fibres amyloïdes^{167,168}. Il n'est donc pas impossible que de tels processus puissent exister dans d'autres structures amyloïdes.

Un autre aspect intéressant à étudier est les propriétés optiques de ces matériaux qui sont très liées à leurs propriétés semi-conductrices et à leur structure. L'existence d'une forte densité de liaisons-H entre les brins- β de la structure des fibres, toutes dirigées parallèlement à l'axe

de la fibre, peut conduire à des effets de confinement quantique pour les protons. En effet, leur déplacement est alors limité : il n'est possible que dans la direction de la liaison-H. Ces effets seraient notamment à l'origine de la fluorescence bleue observée chez des fibres amyloïdes^{126,127}. Des mesures préliminaires de fluorescence (non mentionnées dans ce manuscrit) ont montré que ce type d'effet existait également chez les fibres amyloïdes HET. Dans l'équipe, le Dr. Jonathan Pansieri a également mis en évidence au cours de ses travaux de thèse, d'autres propriétés optiques originales pour les fibres amyloïdes dont les mécanismes restent à éclaircir¹⁹⁵. Cet aspect est l'objet d'une nouvelle thèse au sein de l'équipe, initiée à l'automne 2017.

Finalement, ces biomatériaux figurent comme de bons candidats pour la conversion de signaux électronique/signaux protoniques pour des applications dans des dispositifs type biocapteurs ou pour des interfaces milieux biologiques/électronique. Plusieurs défis restent à relever comme, entre autres, vérifier la biocompatibilité de ces matériaux, contrôler les ROS potentiellement produites, maîtriser le processus d'agrégation des fibres (modulation de leurs propriétés semi-conductrices/optiques), ou encore leur intégration à des dispositifs électroniques... .

Annexe:

Protocole d'expression et de purification de la protéine HET-s(218-289)

I- HET-s (218-289) Expression

I.1. Transformation

- **Materials**

Plasmid: pET-24a(+) HET

Competent cells: *E. Coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL

Antibiotics:

- Kanamycin 25mg/mL (use 2:1000)
- Chloramphenicol 34mg/mL (use 1:1000)

Culture medium:

- LB (autoclaved) : 90µL
- LB agar (autoclaved) plates with antibiotics:
LB agar at 35 g/L autoclaved (25mL/petri dish)
Wait until LB Agar is around 60 °C and add antibiotics
Store at 4 °C

- **Method (Heat Shock)**

- Thaw competent cells and plasmid solution on ice (4 °C)
- Add from 1µg of plasmid in an Eppendorf tube and add 10 µL of competent cells. Do not shake.
- Keep on ice 30'
- Heat shock cells for 1'30'' at 42 °C
- Keep on ice 5'
- Add 90 µL of room temperature LB (without antibiotics)
- Incubate 1 h at 37 °C with shaking 200 rpm
- Dispense 100 µL on the agar plate
- Incubate a night at 37 °C, plate upside down
- Store at 4 °C, plate upside down

I.2. Culture

- **Materials**

Antibiotics:

- Kanamycin 25mg/mL (use 2:1000)
- Chloramphenicol 34mg/mL (use 1:1000)

Culture mediums: LB autoclaved: preculture1 5mL + preculture2 100mL + main culture 1L

IPTG 1M: 1mL for 1L of culture

Buffer Tris 50mM, NaCl 150mM, pH8: 30mL by liter of culture

- **Method** (2days)

Preculture1 5mL (morning): Inoculate 1 colony from the plate in 5mL of LB + antibiotics. Incubate at 37 °C, 200 rpm.

Preculture2 100mL (evening): Add 5 mL of preculture1 to 100 mL of LB + antibiotics. Incubate at 37°C, 200 rpm overnight.

Culture 1L:

- Add 20 mL of preculture2 in 1L of LB + antibiotics. Incubate at 37 °C, 200 rpm.
- Measure OD₆₀₀ and induce with 1mL of IPTG when OD₆₀₀ reach 1
- Wait 4 h
- Centrifuge 20' at 4000g
- Resuspend pellet of 1 L of culture into 30 mL of Buffer Tris 50mM, NaCl 150mM, pH 8
- Centrifuge 20' at 7500 rpm in falcon tubes
- Store pellet at -80 °C after freezing with nitrogen

I- HET-s (218-289) Purification

II.1. Inclusion body extraction

- **Materials**

- **Buffer A:** Tris 50mM, NaCl 150mM, pH 8. Filter at 0.2µm
- **Buffer C:** Tris 50mM, NaCl 150mM, GuHCl 7.5M, pH 8. Filter at 0.45µm

- **Method**

- Thaw cell pellet on ice and resuspend pellet in 30 mL of buffer A
- Sonicate by 10' sequences (10'' spaced by 10'') at 10 %

- Centrifuge for 30' at 10000g, discard supernatant
- Resuspend in 20 mL of buffer A + 2% of Triton X-100 (0.4mL)
- Incubate 200 at 37°C, 230rpm

- Centrifuge for 10' at 50000g, discard supernatant
- Resuspend in 30 mL of buffer A
- Incubate 2 h at 37°C, 230rpm

- Centrifuge for 10' at 50000g, discard supernatant
- Resuspend in 25 mL of buffer C
- Incubate at 40°C overnight with agitation

II.2. Ni-affinity Column Binding

- **Materials**

- **Buffer C:** Tris 50mM, NaCl 150mM, GuHCl 7.5M, pH 8. Filter at 0.45µm
- **Buffer W:** Tris 50 mM, urea 8M, pH 8. Filter at 0.2µm
- **Buffer E:** Tris 50mM, urea 8M, IMDZ 300mM, pH 8. Filter at 0.2µm

- 1 MWCO dialysis membrane
- Amiko 3K tube

- **Method**

- Sonicate by 10' sequences(10'' spaced by 10'') at 10 %
- Centrifuge for 1 h at 50000 g, discard pellet
- Filter supernatant with a 0.45 µm filter

- Wash the column with ethanol 20%, then with water
- Equilibrate the column with Buffer C
- Charge the protein
- Wash with Buffer C
- Wash with buffer W
- Elute with buffer E, collect fractions
- Wash the column with water then with ethanol 20%

- Dialyse with 1 MWCO membrane against wanted buffer overnight
- Concentrate samples with Amico 3K tubes and centrifugation max 7000g

Bibliographie

1. Noy, A. Bionanoelectronics. *Adv. Mater.* **23**, 807–820 (2011).
2. Zhang, A. & Lieber, C. M. Nano-Bioelectronics. *Chem. Rev.* **116**, 215–257 (2016).
3. Willner, I. & Katz, E. *Bioelectronics: from theory to applications*. (WILEY-VCH, 2005).
4. Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. & Estrela, P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* **60**, 1–8 (2016).
5. Clark, L. C. & Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 29–45 (1962).
6. MARINESCO, S. & PERNOT, P. Biocapteurs implantables. *Tech. Ing. Nanotechnologies Biotechnol. Pour Santé* **base documentaire : TIB608DUO.**, (2017).
7. Costa e Silva, J. A. & Steffen, R. E. The future of psychiatry: brain devices. *Metabolism* **69**, S8–S12 (2017).
8. Navarro, X. *et al.* A critical review of interfaces with the peripheral nervous system for the control of neuroprostheses and hybrid bionic systems. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **10**, 229–258 (2005).
9. Margalit, E. *et al.* Retinal prosthesis for the blind. *Surv. Ophthalmol.* **47**, 335–356 (2002).
10. Wilson, B. S. *et al.* Better speech recognition with cochlear implants. *Nature* **352**, 236–238 (1991).
11. Moe-Behrens, G. H. The biological microprocessor, or how to build a computer with biological parts. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **7**, e201304003 (2013).
12. Nicolau, D. V. *et al.* Parallel computation with molecular-motor-propelled agents in nanofabricated networks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201510825 (2016).
13. Roquet, N., Soleimany, A. P., Ferris, A. C., Aaronson, S. & Lu, T. K. Synthetic recombinase-based state machines in living cells. *Science* **353**, aad8559–aad8559 (2016).
14. Katz, E. & Pita, M. Biofuel Cells Controlled by Logically Processed Biochemical Signals: Towards Physiologically Regulated Bioelectronic Devices. *Chem. Eur. J.* **15**, 12554–12564 (2009).
15. Cinquin, P. *et al.* A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats. *PLoS ONE* **5**, e10476 (2010).

16. Cosnier, S., Le Goff, A. & Holzinger, M. Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review. *Electrochem. Commun.* **38**, 19–23 (2014).
17. Göpel, W. & Heiduschka, P. Introduction to bioelectronics: ‘interfacing biology with electronics’. *Biosens. Bioelectron.* **9**, iii–xiii (1994).
18. Rivnay, J., Owens, R. M. & Malliaras, G. G. The Rise of Organic Bioelectronics. *Chem. Mater.* **26**, 679–685 (2014).
19. Malliaras, G. G. Organic bioelectronics: A new era for organic electronics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1830**, 4286–4287 (2013).
20. Lanzani, G. Materials for bioelectronics: Organic electronics meets biology. *Nat. Mater.* **13**, 775–776 (2014).
21. Khodagholy, D. *et al.* High transconductance organic electrochemical transistors. *Nat. Commun.* **4**, 2133 (2013).
22. ATTIAS, A.-J. Polymères conjugués et électronique organique. *Tech. Ing. Appl. Plast. base documentaire : TIB141DUO*, (2017).
23. Wang, X., Shapiro, B. & Smela, E. Visualizing Ion Currents in Conjugated Polymers. *Adv. Mater.* **16**, 1605–1609 (2004).
24. Khodagholy, D. *et al.* In vivo recordings of brain activity using organic transistors. *Nat. Commun.* **4**, 1575 (2013).
25. Stavrinidou, E. *et al.* Direct Measurement of Ion Mobility in a Conducting Polymer. *Adv. Mater.* **25**, 4488–4493 (2013).
26. Isaksson, J. *et al.* Electronic control of Ca^{2+} signalling in neuronal cells using an organic electronic ion pump. *Nat. Mater.* **6**, 673–679 (2007).
27. Nagle, J. F., Mille, M. & Morowitz, H. J. Theory of hydrogen bonded chains in bioenergetics. *J. Chem. Phys.* **72**, 3959–3971 (1980).
28. Meredith, P., Bettinger, C. J., Irimia-Vladu, M., Mostert, A. B. & Schwenn, P. E. Electronic and optoelectronic materials and devices inspired by nature. *Rep. Prog. Phys.* **76**, 034501 (2013).
29. Ramaswamy, P., Wong, N. E. & Shimizu, G. K. H. MOFs as proton conductors ? challenges and opportunities. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 5913–5932 (2014).
30. Kreuer, K.-D., Rabenau, A. & Weppner, W. Vehicle Mechanism, A New Model for the Interpretation of the Conductivity of Fast Proton Conductors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **21**, 208–209 (1982).
31. Ueki, T. & Watanabe, M. Macromolecules in Ionic Liquids: Progress, Challenges, and Opportunities. *Macromolecules* **41**, 3739–3749 (2008).

32. Deng, Y. *et al.* H⁺-type and OH⁻-type biological protonic semiconductors and complementary devices. *Sci. Rep.* **3**, 2481 (2013).
33. Eigen, M. & de Maeyer, L. Self-Dissociation and Protonic Charge Transport in Water and Ice. *Proc. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **247**, 505–533 (1958).
34. Cukierman, S. Et tu, Grotthuss! and other unfinished stories. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1757**, 876–885 (2006).
35. Riccardi, D. *et al.* “Proton Holes” in Long-Range Proton Transfer Reactions in Solution and Enzymes: A Theoretical Analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 16302–16311 (2006).
36. Kreuer, K. D. On the complexity of proton conduction phenomena. *Solid State Ion.* **136**, 149–160 (2000).
37. Decoursey, T. E. Voltage-Gated Proton Channels and Other Proton Transfer Pathways. *Physiol. Rev.* **83**, 475–579 (2003).
38. Walbran, S. & Kornyshev, A. A. Proton transport in polarizable water. *J. Chem. Phys.* **114**, 10039–10048 (2001).
39. Miyake, T. & Rolandi, M. Grotthuss mechanisms: from proton transport in proton wires to bioprotonic devices. *J. Phys. Condens. Matter* **28**, 023001 (2016).
40. Phang, W. J. *et al.* pH-Dependent Proton Conducting Behavior in a Metal-Organic Framework Material. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 8383–8387 (2014).
41. Weiss, J. The formation and structure of some organic molecular compounds. *J. Chem. Soc. Resumed* 245–252 (1942).
42. Rich, P. R. *The molecular machinery of Keilin's respiratory chain.* (Portland Press Limited, 2003).
43. Nelson, N. & Ben-Shem, A. The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 971–982 (2004).
44. Chapman, S. K. & Mount, A. R. Electron transfer in proteins. *Nat. Prod. Rep.* **12**, 93–100 (1995).
45. Amdursky, N. Electron Transfer across Helical Peptides. *ChemPlusChem* **80**, 1075–1095 (2015).
46. Long, Y.-T., Abu-Irhayem, E. & Kraatz, H.-B. Peptide Electron Transfer: More Questions than Answers. *Chem. Eur. J.* **11**, 5186–5194 (2005).
47. Giese, B., Graber, M. & Cordes, M. Electron transfer in peptides and proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 755–759 (2008).

48. Cordes, M. *et al.* Influence of Amino Acid Side Chains on Long-Distance Electron Transfer in Peptides: Electron Hopping via “Stepping Stones”. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 3461–3463 (2008).
49. Shih, C. *et al.* Tryptophan-accelerated electron flow through proteins. *Science* **320**, 1760–1762 (2008).
50. Shah, A. *et al.* Electron transfer in peptides. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 1015–1027 (2015).
51. Bostick, C. D. *et al.* Protein bioelectronics: a review of what we do and do not know. *ArXiv Prepr. ArXiv170205028* (2017).
52. Alberts B, Johnson A, J. A. & Lewis J, et al, L. J. Principles of Membrane Transport. in *Molecular Biology of the Cell. 4th edition* (Garland Science, 2002).
53. Faraudo, J. & Arzo, M. A. Ion transport through biological channels. *Contrib. Sci.* 181–188 (2016).
54. Lodish H, Johnson A, B. A. & Lewis J, et al, Z. S. Section 15.2, Overview of Membrane Transport Proteins. in *Molecular Cell Biology. 4th edition.* (W. H. Freeman, 2000).
55. Ädelroth, P. *et al.* Identification of the Proton Pathway in Bacterial Reaction Centers: Decrease of Proton Transfer Rate by Mutation of Surface Histidines at H126 and H128 and Chemical Rescue by Imidazole Identifies the Initial Proton Donors [†]. *Biochemistry (Mosc.)* **40**, 14538–14546 (2001).
56. Nagle, J. F. & Morowitz, H. J. Molecular mechanisms for proton transport in membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **75**, 298–302 (1978).
57. Brändén, M. *et al.* On the role of the K-proton transfer pathway in cytochrome c oxidase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **98**, 5013–5018 (2001).
58. Ramsey, I. S. *et al.* An aqueous H⁺ permeation pathway in the voltage-gated proton channel Hv1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 869–875 (2010).
59. Lerner Yardeni, J., Amit, M., Ashkenasy, G. & Ashkenasy, N. Sequence dependent proton conduction in self-assembled peptide nanostructures. *Nanoscale* **8**, 2358–2366 (2016).
60. Weinberg, D. R. *et al.* Proton-Coupled Electron Transfer. *Chem. Rev.* **112**, 4016–4093 (2012).
61. Hammes-Schiffer, S. Proton-coupled electron transfer: classification scheme and guide to theoretical methods. *Energy Environ. Sci.* **5**, 7696 (2012).
62. Barry, B. A. Proton coupled electron transfer and redox active tyrosines in Photosystem II. *J. Photochem. Photobiol. B* **104**, 60–71 (2011).
63. Hammes-Schiffer, S. & Stuchebrukhov, A. A. Theory of Coupled Electron and Proton Transfer Reactions. *Chem. Rev.* **110**, 6939–6960 (2010).

64. Reece, S. Y. & Nocera, D. G. Proton-Coupled Electron Transfer in Biology: Results from Synergistic Studies in Natural and Model Systems. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 673–699 (2009).
65. Chen, X. *et al.* Proton-Regulated Electron Transfers from Tyrosine to Tryptophan in Proteins: Through-Bond Mechanism versus Long-Range Hopping Mechanism. *J. Phys. Chem. B* **113**, 16681–16688 (2009).
66. Amdursky, N. *et al.* Electronic Transport via Proteins. *Adv. Mater.* **26**, 7142–7161 (2014).
67. Martinez, C. R. & Iverson, B. L. Rethinking the term “pi-stacking”. *Chem. Sci.* **3**, 2191 (2012).
68. Gazit, E. A possible role for π -stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB J.* **16**, 77–83 (2002).
69. Peyrard, M. Glass transition in protein hydration water. *Phys. Rev. E* **64**, (2001).
70. Hummer, G. & Tokmakoff, A. Preface: Special Topic on Biological Water. *J. Chem. Phys.* **141**, 22D101 (2014).
71. Giacomantonio, C. Charge transport in melanin, a disordered bio-organic conductor. *Univ. Qld.* (2005).
72. Lin, J. The Nature of Aqueous Tunneling Pathways Between Electron-Transfer Proteins. *Science* **310**, 1311–1313 (2005).
73. Rosenberg, B. Electrical Conductivity of Proteins. *Nature* **193**, 364–365 (1962).
74. Careri, G. Cooperative charge fluctuations by migrating protons in globular proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **70**, 223–249 (1998).
75. Powell, M. R. & Rosenberg, B. The nature of the charge carriers in solvated biomacromolecules. *J. Bioenerg.* **1**, 493–509 (1970).
76. Efros, A. L. *Physics and Geometry of Disorder - Percolation Theory*. (MIR, 1986).
77. Gorby, Y. A. *et al.* Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **103**, 11358–11363 (2006).
78. Malvankar, N. S. & Lovley, D. R. Microbial Nanowires: A New Paradigm for Biological Electron Transfer and Bioelectronics. *ChemSusChem* **5**, 1039–1046 (2012).
79. Malvankar, N. S. *et al.* Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 573–579 (2011).
80. El-Naggar, M. Y. *et al.* Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **107**, 18127–18131 (2010).

81. Polizzi, N. F., Skourtis, S. S. & Beratan, D. N. Physical constraints on charge transport through bacterial nanowires. *Faraday Discuss.* **155**, 43–61 (2012).
82. Kumar, A. *et al.* The ins and outs of microorganism–electrode electron transfer reactions. *Nat. Rev. Chem.* **1**, 0024 (2017).
83. McGinness, J., Corry, P. & Proctor, P. Amorphous Semiconductor Switching in Melanins. *Science* **183**, 853–855 (1974).
84. Bernardus Mostert, A., Powell, B. J., Gentle, I. R. & Meredith, P. On the origin of electrical conductivity in the bio-electronic material melanin. *Appl. Phys. Lett.* **100**, 093701 (2012).
85. Eley, D. D. & Spivey, D. I. Semiconductivity of organic substances. Part 8.—Porphyrins and dipyrromethenes. *Trans. Faraday Soc.* **58**, 405–410 (1962).
86. Głowacki, E. D., Irimia-Vladu, M., Bauer, S. & Sariciftci, N. S. Hydrogen-bonds in molecular solids – from biological systems to organic electronics. *J. Mater. Chem. B* **1**, 3742 (2013).
87. Armitage, N. P., Briman, M. & Grüner, G. Charge transfer and charge transport on the double helix. *Phys. Status Solidi B* **241**, 69–75 (2004).
88. Leveritt, J. M., Dibaya, C., Tesar, S., Shrestha, R. & Burin, A. L. One-dimensional confinement of electric field and humidity dependent DNA conductivity. *J. Chem. Phys.* **131**, 245102 (2009).
89. Ordinario, D. D., Phan, L., Jocson, J.-M., Nguyen, T. & Gorodetsky, A. A. Protonic transistors from thin reflectin films. *APL Mater.* **3**, 014907 (2015).
90. Wu, G. *et al.* Artificial Synaptic Devices Based on Natural Chicken Albumen Coupled Electric-Double-Layer Transistors. *Sci. Rep.* **6**, 23578 (2016).
91. Ordinario, D. D. *et al.* Bulk protonic conductivity in a cephalopod structural protein. *Nat. Chem.* **6**, 596–602 (2014).
92. Scheibel, T. *et al.* Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **100**, 4527–4532 (2003).
93. Castillo, J., Tanzi, S., Dimaki, M. & Svendsen, W. Manipulation of self-assembly amyloid peptide nanotubes by dielectrophoresis. *Electrophoresis* **29**, 5026–5032 (2008).
94. Del Mercato, L. L. *et al.* Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18019–18024 (2007).
95. Domigan, L. J., Healy, J. P., Meade, S. J., Blaikie, R. J. & Gerrard, J. A. Controlling the dimensions of amyloid fibrils: Toward homogenous components for bionanotechnology. *Biopolymers* **97**, 123–133 (2012).

96. Creasey, R. C. G., Shingaya, Y. & Nakayama, T. Improved electrical conductance through self-assembly of bioinspired peptides into nanoscale fibers. *Mater. Chem. Phys.* **158**, 52–59 (2015).
97. Amit, M., Cheng, G., Hamley, I. W. & Ashkenasy, N. Conductance of amyloid β based peptide filaments: structure–function relations. *Soft Matter* **8**, 8690 (2012).
98. Glasser, L. Proton conduction and injection in solids. *Chem. Rev.* **75**, 21–65 (1975).
99. Wünsche, J., Cicoira, F., Graeff, C. F. O. & Santato, C. Eumelanin thin films: solution-processing, growth, and charge transport properties. *J. Mater. Chem. B* **1**, 3836 (2013).
100. Chiti, F. *et al.* Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **96**, 3590–3594 (1999).
101. Sipe, J. D. *et al.* Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid* **23**, 209–213 (2016).
102. Pham, C. L. L., Kwan, A. H. & Sunde, M. Functional amyloid: widespread in Nature, diverse in purpose. *Essays Biochem.* **56**, 207–219 (2014).
103. Fowler, D. M. *et al.* Functional Amyloid Formation within Mammalian Tissue. *PLoS Biol.* **4**, e6 (2005).
104. Kaminski, C. F. & Kaminski Schierle, G. S. Probing amyloid protein aggregation with optical superresolution methods: from the test tube to models of disease. *Neurophotonics* **3**, 041807 (2016).
105. Meinhardt, J., Sachse, C., Hortschansky, P., Grigorieff, N. & Fändrich, M. A β (1-40) Fibril Polymorphism Implies Diverse Interaction Patterns in Amyloid Fibrils. *J. Mol. Biol.* **386**, 869–877 (2009).
106. Nielsen, L. *et al.* Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism [?] *Biochemistry (Mosc.)* **40**, 6036–6046 (2001).
107. Tiiman, A., Krishtal, J., Palumaa, P. & T?ugu, V. In vitro fibrillization of Alzheimer's amyloid- β peptide (1-42). *AIP Adv.* **5**, 092401 (2015).
108. Lemkul, J. A. & Bevan, D. R. The Role of Molecular Simulations in the Development of Inhibitors of Amyloid β -Peptide Aggregation for the Treatment of Alzheimer's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **3**, 845–856 (2012).
109. Jiménez, J. L. *et al.* The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **99**, 9196–9201 (2002).
110. Wei, G. *et al.* Self-assembling peptide and protein amyloids: from structure to tailored function in nanotechnology. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4661-4708 (2017)

111. Goldsbury, C. *et al.* Amyloid structure and assembly: Insights from scanning transmission electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **173**, 1–13 (2011).
112. Serpell, L. C. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1502**, 16–30 (2000).
113. Sunde, M. *et al.* Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction 1 Edited by F. E. Cohen. *J. Mol. Biol.* **273**, 729–739 (1997).
114. Maurer-Stroh, S. *et al.* Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. *Nat. Methods* **7**, 237–242 (2010).
115. Makin, O. S., Atkins, E., Sikorski, P., Johansson, J. & Serpell, L. C. Molecular basis for amyloid fibril formation and stability. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **102**, 315–320 (2005).
116. Sawaya, M. R. *et al.* Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers. *Nature* **447**, 453–457 (2007).
117. Iwata, K. *et al.* 3D structure of amyloid protofilaments of β 2-microglobulin fragment probed by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 18119–18124 (2006).
118. Wälti, M. A. *et al.* Atomic-resolution structure of a disease-relevant A β (1-42) amyloid fibril. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **113**, E4976–E4984 (2016).
119. Wasmer, C. *et al.* Amyloid Fibrils of the HET-s(218-289) Prion Form a β Solenoid with a Triangular Hydrophobic Core. *Science* **319**, 1523–1526 (2008).
120. Zhang, F.-C. *et al.* Mechanical Manipulation Assisted Self-Assembly To Achieve Defect Repair and Guided Epitaxial Growth of Individual Peptide Nanofilaments. *ACS Nano* **4**, 5791–5796 (2010).
121. Peralta, M. D. R. *et al.* Engineering Amyloid Fibrils from β -Solenoid Proteins for Biomaterials Applications. *ACS Nano* **9**, 449–463 (2015).
122. Altamura, L. *et al.* A synthetic redox biofilm made from metalloprotein prion domain chimera nanowires. *Nat. Chem.* **9**, 157–163 (2016).
123. Woolfson, D. N. & Mahmoud, Z. N. More than just bare scaffolds: towards multi-component and decorated fibrous biomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 3464 (2010).
124. Knowles, T. P. J. & Buehler, M. J. Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 469–479 (2011).
125. Rogers, S. S. *et al.* Investigating the permanent electric dipole moment of β -lactoglobulin fibrils, using transient electric birefringence. *Biopolymers* **82**, 241–252 (2006).
126. Tcherkasskaya, O. Photo-activity induced by amyloidogenesis. *Protein Sci.* **16**, 561–571 (2007).

127. Chan, F. T. S. *et al.* Protein amyloids develop an intrinsic fluorescence signature during aggregation. *The Analyst* **138**, 2156 (2013).
128. Handelman, A., Beker, P., Amdursky, N. & Rosenman, G. Physics and engineering of peptide supramolecular nanostructures. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 6391 (2012).
129. Pinotsi, D. *et al.* Proton Transfer and Structure-Specific Fluorescence in Hydrogen Bond-Rich Protein Structures. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3046–3057 (2016).
130. Knowles, T. P. J. & Mezzenga, R. Amyloid Fibrils as Building Blocks for Natural and Artificial Functional Materials. *Adv. Mater.* **28**, 6546–6561 (2016).
131. Zhong, C. *et al.* Strong underwater adhesives made by self-assembling multi-protein nanofibres. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 858–866 (2014).
132. Li, D. *et al.* Structure-Based Design of Functional Amyloid Materials. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 18044–18051 (2014).
133. An, B. *et al.* Diverse Supramolecular Nanofiber Networks Assembled by Functional Low-Complexity Domains. *ACS Nano* **11**, 6985–6995 (2017).
134. Amit, M. *et al.* Hybrid Proton and Electron Transport in Peptide Fibrils. *Adv. Funct. Mater.* **24**, 5873–5880 (2014).
135. Wang, X., Li, Y. & Zhong, C. Amyloid-directed assembly of nanostructures and functional devices for bionanoelectronics. *J Mater Chem B* **3**, 4953–4958 (2015).
136. Kasotakis, E. *et al.* Design of metal-binding sites onto self-assembled peptide fibrils. *Biopolymers* **92**, 164–172 (2009).
137. Povilonienė, S. *et al.* Functionalization of α -synuclein fibrils. *Beilstein J. Nanotechnol.* **6**, 124–133 (2015).
138. Reches, M. Casting Metal Nanowires Within Discrete Self-Assembled Peptide Nanotubes. *Science* **300**, 625–627 (2003).
139. Malisauskas, M., Meskys, R. & Morozova-Roche, L. A. Ultrathin silver nanowires produced by amyloid biotemplating. *Biotechnol. Prog.* **24**, 1166–1170 (2008).
140. Carny, O., Shalev, D. E. & Gazit, E. Fabrication of Coaxial Metal Nanocables Using a Self-Assembled Peptide Nanotube Scaffold. *Nano Lett.* **6**, 1594–1597 (2006).
141. Larsen, M. B., Andersen, K. B., Svendsen, W. E. & Castillo-León, J. Self-Assembled Peptide Nanotubes as an Etching Material for the Rapid Fabrication of Silicon Wires. *BioNanoScience* **1**, 31–37 (2011).
142. Lee, D. *et al.* Photoconductivity of Pea-Pod-Type Chains of Gold Nanoparticles Encapsulated within Dielectric Amyloid Protein Nanofibrils of α -Synuclein. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 1332–1337 (2011).

143. Choi, Y. S., Kim, J., Bhak, G., Lee, D. & Paik, S. R. Photoelectric Protein Nanofibrils of α -Synuclein with Embedded Iron and Phthalocyanine Tetrasulfonate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 6070-6074 (2011).
144. Altamura, L. Bio-inspired protein nanowire : electrical conductivity and use as redox mediator for enzyme wiring. Thèse, Université J. Fourier-Grenoble I (2015).
145. Meier, C., Lifincev, I. & Welland, M. E. Conducting Core-Shell Nanowires by Amyloid Nanofiber Templated Polymerization. *Biomacromolecules* **16**, 558-563 (2015).
146. Hamedi, M., Herland, A., Karlsson, R. H. & Inganäs, O. Electrochemical Devices Made from Conducting Nanowire Networks Self-Assembled from Amyloid Fibrils and Alkoxysulfonate PEDOT. *Nano Lett.* **8**, 1736-1740 (2008).
147. Benkemoun, L. & Saupe, S. J. Prion proteins as genetic material in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **43**, 789-803 (2006).
148. Van Melckebeke, H. *et al.* Probing Water Accessibility in HET-s(218-289) Amyloid Fibrils by Solid-State NMR. *J. Mol. Biol.* **405**, 765-772 (2011).
149. Sabaté, R. *et al.* Prion and Non-prion Amyloids of the HET-s Prion forming Domain. *J. Mol. Biol.* **370**, 768-783 (2007).
150. Mizuno, N., Baxa, U. & Steven, A. C. Structural dependence of HET-s amyloid fibril infectivity assessed by cryoelectron microscopy. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **108**, 3252-3257 (2011).
151. Daskalov, A. *et al.* Contribution of Specific Residues of the β -Solenoid Fold to HET-s Prion Function, Amyloid Structure and Stability. *PLoS Pathog.* **10**, e1004158 (2014).
152. Balguerie, A. *et al.* Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of *Podospora anserina*. *EMBO J.* **22**, 2071-2081 (2003).
153. Wasmer, C. *et al.* Solid-State NMR Spectroscopy Reveals that E.coli Inclusion Bodies of HET-s(218-289) are Amyloids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 4858-4860 (2009).
154. Carmignani, C. *et al.* Development of Characterization Platform Dedicated to Bio-Inspired Objects at the Nanoscale. *ECS Trans.* **72**, 183-190 (2016).
155. McDonald, M. *et al.* Fiber Diffraction Data Indicate a Hollow Core for the Alzheimer's A β 3-Fold Symmetric Fibril. *J. Mol. Biol.* **423**, 454-461 (2012).
156. Pujadas, L. *et al.* Reelin delays amyloid-beta fibril formation and rescues cognitive deficits in a model of Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* **5**, 3443 (2014).
157. Geurst, J. A. Theory of space-charge-limited currents in thin semiconductor layers. *Phys. Status Solidi B* **15**, 107-118 (1966).
158. Anthony, J. E. The Larger Acenes: Versatile Organic Semiconductors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 452-483 (2008).

159. Carbone, A., Kotowska, B. K. & Kotowski, D. Space-Charge-Limited Current Fluctuations in Organic Semiconductors. *Phys. Rev. Lett.* **95**, (2005).
160. Kleine-Ostmann, T. *et al.* Conductivity of single-stranded and double-stranded deoxyribose nucleic acid under ambient conditions: The dominance of water. *Appl. Phys. Lett.* **88**, 102102 (2006).
161. Rosenberg, B. Electrical Conductivity of Proteins. II. Semiconduction in Crystalline Bovine Hemoglobin. *J. Chem. Phys.* **36**, 816–823 (1962).
162. Wünsche, J. *et al.* Protonic and Electronic Transport in Hydrated Thin Films of the Pigment Eumelanin. *Chem. Mater.* **27**, 436–442 (2015).
163. Drogui, P., Elmaleh, S., Rumeau, M., Bernard, C. & Rambaud, A. Hydrogen peroxide production by water electrolysis: application to disinfection. *J. Appl. Electrochem.* **31**, 877–882 (2001).
164. Le Caër, S. *et al.* A trapped water network in nanoporous material: the role of interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 17658 (2011).
165. Wraight, C. A. Chance and design—Proton transfer in water, channels and bioenergetic proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1757**, 886–912 (2006).
166. Fichou, Y. *et al.* Hydration water mobility is enhanced around tau amyloid fibers. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **112**, 6365–6370 (2015).
167. Thirumalai, D., Reddy, G. & Straub, J. E. Role of Water in Protein Aggregation and Amyloid Polymorphism. *Acc. Chem. Res.* **45**, 83–92 (2012).
168. Perutz, M. F., Finch, J. T., Berriman, J. & Lesk, A. Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **99**, 5591–5595 (2002).
169. Reddy, G., Straub, J. E. & Thirumalai, D. Dry amyloid fibril assembly in a yeast prion peptide is mediated by long-lived structures containing water wires. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **107**, 21459–21464 (2010).
170. Wan, W. *et al.* Degradation of Fungal Prion HET-s(218-289) Induces Formation of a Generic Amyloid Fold. *Biophys. J.* **102**, 2339–2344 (2012).
171. Wan, W. & Stubbs, G. Heterogeneous seeding of HET-s(218–289) and the mutability of prion structures. *Prion* **8**, 178–182 (2014).
172. Wan, W. & Stubbs, G. Fiber Diffraction of the Prion-Forming Domain HET-s(218–289) Shows Dehydration-Induced Deformation of a Complex Amyloid Structure. *Biochemistry (Mosc.)* **53**, 2366–2370 (2014).
173. Stein, D., Kruithof, M. & Dekker, C. Surface-Charge-Governed Ion Transport in Nanofluidic Channels. *Phys. Rev. Lett.* **93**, (2004).

174. Shao, J.-J., Raidongia, K., Koltonow, A. R. & Huang, J. Self-assembled two-dimensional nanofluidic proton channels with high thermal stability. *Nat. Commun.* **6**, 7602 (2015).
175. Tokita, Y. *et al.* Protein Photoconductors and Photodiodes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 11663–11666 (2011).
176. Mostert, A. B. *et al.* Role of semiconductivity and ion transport in the electrical conduction of melanin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **109**, 8943–8947 (2012).
177. Lin, S.-H., Fujitsuka, M. & Majima, T. Sequence-Dependent Photocurrent Generation through Long-Distance Excess-Electron Transfer in DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 8715–8717 (2016).
178. Haghighat, S., Ostresh, S. & Dawlaty, J. M. Controlling Proton Conductivity with Light: A Scheme Based on Photoacid Doping of Materials. *J. Phys. Chem. B* **120**, 1002–1007 (2016).
179. Hoang, C. V. *et al.* Interplay of hot electrons from localized and propagating plasmons. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
180. Nakanishi, H. *et al.* Photoconductance and inverse photoconductance in films of functionalized metal nanoparticles. *Nature* **460**, 371–375 (2009).
181. Yang, Y. *et al.* Hot Carrier Trapping Induced Negative Photoconductance in InAs Nanowires toward Novel Nonvolatile Memory. *Nano Lett.* **15**, 5875–5882 (2015).
182. Nowak, M. *et al.* Transient characteristics and negative photoconductivity of SbSI humidity sensor. *Sens. Actuators Phys.* **210**, 32–40 (2014).
183. Pirralho, M. J. P. *et al.* Transition from negative to positive photoconductivity in p - type P b 1 – x E u x Te films. *Phys. Rev. B* **95**, (2017).
184. Gogurla, N., Sinha, A. K., Naskar, D., Kundu, S. C. & Ray, S. K. Metal nanoparticles triggered persistent negative photoconductivity in silk protein hydrogels. *Nanoscale* **8**, 7695–7703 (2016).
185. Schmid, F.-X. Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. in *eLS* (John Wiley & Sons, Ltd, 2001). doi:10.1038/npg.els.0003142
186. Sander, M. U., Luther, K. & Troe, J. Excitation energy dependence of the photoionization of liquid water. *J. Phys. Chem.* **97**, 11489–11492 (1993).
187. Khusnatdinov, N. N. & Petrenko, V. F. Experimental study of ice electrolysis under UV irradiation. *J. Phys. Chem. B* **101**, 6208–6211 (1997).
188. Fry, E. S. Visible and near-ultraviolet absorption spectrum of liquid water: comment. *Appl. Opt.* **39**, 2743–2744 (2000).

189. Modestov, A. D., Gun, J. & Lev, O. Graphite photoelectrochemistry 2. Photoelectrochemical studies of highly oriented pyrolytic graphite. *J. Electroanal. Chem.* **476**, 118–131 (1999).
190. Modestov, A. D., Gun, J. & Lev, O. Graphite photoelectrochemistry study of glassy carbon, carbon-fiber and carbon-black electrodes in aqueous electrolytes by photocurrent response. *Surf. Sci.* **417**, 311–322 (1998).
191. Antoine, O. & Augustynski, J. Photo-electrochemical behaviour of glassy carbon. *Electrochem. Commun.* **3**, 195–198 (2001).
192. Tedesco, A. C., Martínez, L. & González, S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**, 561–575 (1997).
193. Creed, D. The photophysics and photochemistry of the near-UV absorbing amino-acids-I tryptophan and its simple derivatives. *Photochem. Photobiol.* **39**, 537–562 (2008).
194. Schindewolf, U. Formation and Properties of Solvated Electrons. *Angew. Chem. Int. Ed.* **7**, 190–203 (1968).
195. Pansieri, J. Les amyloïdoses : détection à l'aide de nanoparticules et propriétés optiques originales. (2017).