

# Abstract

Single molecule fluorescence techniques enable to monitor the molecular dynamics and interactions in the biological processes. Nowadays, the molecular dynamics of proteins is principally accompanied by external fluorescent labeling in order to maintain a bright and sustainable fluorescence source from the analyte molecule. However, an externally attached molecule might perturb the protein conformation and activity, moreover, its presence induces unwanted side interactions. Fortunately, a vast majority of proteins contain such amino acid residues as tryptophan and tyrosine that absorb and emit light in the UV range of 260-400 nm, which opens a perspective to detect their fluorescence label-free. These intrinsically fluorescent amino acids yield limited absorption cross-section, quantum yield, and photostability in the UV range, which hampers label-free protein fluorescence detection at the single molecule level.

In order to reach single molecule sensitivity of protein UV autofluorescence, we develop a time-resolved UV confocal microscope with 266 nm and 295 nm pulsed laser excitations and the detection optics in the near UV. Based on the total fluorescence time traces, we quantify the single molecule sensitivity, the effect of photostabilization techniques on the protein autofluorescence. Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and time-correlated single photon counting (TCSPC) measurements provide quantitative information on the detection volume, the fluorescence enhancement factors, and the accelerated photokinetics of the UV emitting molecules in the presence and absence of the aluminum nanostructures. Optimizations of the nanostructure design and the chemical photostabilization of proteins manifest a powerful and valuable tool to improve the quality of single molecule detection.

Using p-terphenyl as a bright UV emitting molecule, we optimize the aluminum plasmonic nanostructures, to some extent, to enhance the single molecule fluorescence. Additionally, we discuss the unexpected effects found in the experiments of UV aluminum plasmonics in aqueous solutions. Under certain conditions, the light confinement and fluorescence enhancement in the aluminum nanostructures enable to apply the UV plasmonics for the single molecule detection of label-free  $\beta$ -galactosidase protein.

Keywords: intrinsic UV fluorescence, fluorescence correlation spectroscopy (FCS), single molecule detection, tryptophan, photostabilization

# Résumé

Les techniques de fluorescence de molécule individuelle permettent de suivre la dynamique moléculaire et les interactions dans les processus biologiques. Maintenant, la dynamique moléculaire des protéines est principalement accompagnée du marquage fluorescent externe pour maintenir une source de fluorescence lumineuse et durable de la molécule d'intérêt. Cependant, une molécule externe attachée peut perturber la conformation et activité des protéines, ainsi que sa présence induit des interactions secondaires indésirables. Heureusement, la majorité des protéines contiennent des acides aminés comme le tryptophane ou la tyrosine qui absorbent et émettent la lumière dans le domaine spectral d'UV entre 260 nm et 400 nm. Ces acides aminés, intrinsèquement fluorescents, ont la section efficace d'absorption limitée, de basses efficacité quantique et photostabilité dans le domaine spectral d'UV, qui gênent la détection de fluorescence des protéines sans marquage au niveau des molécules individuelles.

Afin d'atteindre la sensibilité de la molécule individuelle pour l'autofluorescence UV des protéines, nous développons un microscope confocal UV à la résolution temporelle avec les lasers d'excitations de 266 nm et 295 nm pulsés et l'optique de détection dans le proche UV. En se basant sur les traces de temps de la fluorescence totale, nous quantifions la sensibilité des molécules individuelles et l'effet des techniques de photostabilisation sur l'autofluorescence des protéines. La spectroscopie de corrélation de fluorescence (SCF) et les mesures de *time-correlated single photon counting* (TCSPC) fournissent des informations quantitatives par rapport au volume de détection, par rapport aux facteurs d'amélioration de fluorescence, et par rapport à la photokinétique accélérée des molécules émettant à la présence et à l'absence des nanostructures d'aluminium. Les optimisations du design des nanostructures et de la photostabilisation chimique des protéines apparaissent comme un outil puissant de valeur pour améliorer la qualité de détection des molécules individuelles.

En utilisant le p-terphenyl comme une molécule lumineuse émettant l'UV, nous optimisons les nanostructures plasmoniques d'aluminium afin d'améliorer la fluorescence des molécules individuelles. De plus, nous discutons des effets inattendus qui ont été trouvés dans les expériences sur la plasmonique UV d'aluminium aux solutions aqueuses. Sous certaines conditions, le confinement de la lumière et l'amélioration de fluorescence dans les structures d'aluminium permettent d'appliquer la plasmonique UV pour la détection des molécules individuelles de la protéine  $\beta$ -galactosidase sans marquage.

Les mots clés: fluorescence UV intrinsèque, spectroscopie de corrélation de fluorescence (SCF), détection des molécules individuelles, tryptophane, photostabilisation