

Abstract

Single molecule Förster resonance energy transfer (smFRET) is a major technique to measure biomolecular conformations and interactions. However, its range is limited to nanometer distances and nanomolar concentrations. The objective of this PhD thesis is to extend the applicability of smFRET using optical nanostructures such as aluminum nanoapertures to achieve long distance, biologically-relevant micromolar concentration and improved temporal resolution. This breakthrough is achieved by introducing novel nanophotonic elements to manipulate energy transfer. The thesis outcomes will benefit many applications in structural biology, drug discovery and energy conversion at the nanoscale.

In order to improve the single-molecule sensitivity of FRET measurements at longer distances, the classical FRET excitation scheme is improved using pulsed-interleaved excitation (PIE) of two molecules independently with 12.5 ns delay, i.e. one is using the green and red excitation lines at 557 and 635 nm, respectively. Therefore, the FRET pairs lacking donor and acceptor fluorophore, are excluded from post-analysis and the peak of the FRET efficiency which is close to zero is no longer present on the PIE-FRET histogram. Taking advantage of the interaction between surface plasmons of metal and fluorescent molecules, one can achieve the significant enhancement of fluorescence compared to diffraction-limited confocal microscope. Hence, the interaction between fluorophores can be mediated by metal nanostructure. Reducing drastically the observation volume down to zeptoliter volume (10^{-21} L), the single-molecule observations can be achieved with micromolar concentrations which is highly important for studying the interactions between macromolecules.

Using two FRET pairs of the dyes possessing quite different chemical structure, we detect FRET interaction at the distance of 13.6 nm. We probe different diameters of nanoapertures in order to obtain the higher fluorescence gain and get the narrower FRET distributions. We elaborate the passivation protocol of metal surface to prevent any non-specific interaction between surface and the molecules.

We obtain the lifetime information about different cell compartments (actin, septin and plasma membrane) by time-correlated single-photon measurements (TCSPC) to study the interactions at intracellular level. The interaction between free electrons of metal and fluorophore can modify the intrinsic properties of the dye and therefore its lifetime. Lifetime change can be related the distance information of a dye from metal surface. The interaction between the dye and electrons of metal occurs at the range far beyond 10 nm which extends the scope of energy transfer study for the thesis.

The exploiting of nanoapertures opens the possibility for measuring macromolecular interactions. We study the association between antitermination protein LicT and RNA hairpin by means of 2-color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy (FCCS). The main goal is to determine the binding fraction of LicT protein to RNA and binding constant defining the interaction.

Keywords: nanophotonics, single-molecule detection, fluorescence correlation spectroscopy (FCS), fluorescence lifetime imaging, energy transfer.

Résumé en français

La détection de molécule unique utilisant le transfert d'énergie par résonance de type Förster est une technique majeure pour déterminer les conformations et les interactions entre biomolécules. Cependant, cette technique est limitée à des distances inférieures à 10nm et à des concentrations nanomolaires. L'objectif de cette thèse est d'étendre ces distances en utilisant des nanostructures optiques comme des nano-ouvertures à travers une couche d'aluminium afin d'élargir la technique à de plus longues distances, avec des applications biologiques spécifiques en utilisant des concentrations micromolaires et améliorer la résolution temporelle.

Afin d'améliorer la sensibilité des mesures FRET de molécules uniques à large distance, l'excitation classique par FRET est modifiée en utilisant des excitations pulsées (PIE) de deux molécules fluorescentes de manière indépendantes avec un décalage de 12,5 secondes, une ligne d'excitation utilisant un laser vert (557nm) et une autre utilisant le rouge (635 nm). Par conséquent, les paires FRET manquant de fluorophores donneur et accepteur, sont exclues de la post-analyse et le pic de l'efficacité FRET qui est proche de zéro n'est plus présent sur l'histogramme PIE-FRET. Prenant avantage des interactions entre les plasmons de surface du métal et les molécules fluorescentes, une augmentation significative du signal de fluorescence est observée par rapport à la technique de microscopie confocale limitée par la diffraction. Enfin, les interactions entre fluorophores peuvent être influencées par les nanostructures plasmoniques.

En utilisant deux paires de molécules fluorescentes pour le FRET possédant des configurations chimiques différentes, nous détectons une interaction FRET à une distance de 13,6 nm. L'analyse de différents diamètres de nano-ouvertures percées dans un film métallique permet d'obtenir un gain de fluorescence et une meilleure distribution FRET.

L'attrait des nanostructures ouvre la possibilité de détecter les interactions entre macromolécules. Nous avons étudié l'association entre la protéine LicT et un brin d'ARN par la spectroscopie de corrélation croisée de fluorescence (FCCS en anglais). Le but principal est de quantifier la fraction de protéine LicT liée à l'ARN ainsi que la constante définissant l'interaction.

Mot-clés: nanophotonique, spectroscopie de corrélation de fluorescence, transfert d'énergie, imagerie de durée de vie, détection de molécules uniques.