



HAL
open science

Nanocristaux semi-conducteurs et interaction ADN/EcoRV

Pierre Desbiolles

► **To cite this version:**

Pierre Desbiolles. Nanocristaux semi-conducteurs et interaction ADN/EcoRV. Physique [physics].
Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. tel-00118875

HAL Id: tel-00118875

<https://theses.hal.science/tel-00118875>

Submitted on 6 Dec 2006

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

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



Laboratoire Kastler Brossel

Habilitation à diriger des recherches
Université Pierre et Marie Curie

présentée par

Pierre Desbiolles

Sujet :

Nanocristaux semiconducteurs
et interactions ADN/EcoRV

Soutenue le 5 décembre 2006
devant le jury composé de :

Mme	Thérèse Garestier	Invitée
M.	Jean-François Joanny	Invité
M.	Eric Le Cam	Rapporteur
Mme	Lucienne Letellier	Rapporteur
M.	Brahim Lounis	Rapporteur

Table des matières

1	Introduction	3
2	Photophysique de nanocristaux individuels	5
2.1	Présentation, contexte	5
2.2	Intermittence de la fluorescence et vols de Lévy	8
2.3	Dégroupement de la fluorescence	12
3	Accrochage et détection de l'ADN sur une surface	14
3.1	Présentation, contexte	14
3.2	Etirement de molécules d'ADN individuelles au voisinage d'une surface	16
3.3	Détection de l'ADN à l'aide de nanocristaux semi-conducteurs	20
3.4	Détection de courte séquence d'ADN à l'aide de triple hélices	24
4	Interaction d'EcoRV avec des molécules d'ADN étirées	26
4.1	Motivation : diffusion facilitée des protéines le long de l'ADN	26
4.2	EcoRV marquée NCs	29
4.3	EcoRV marquée streptavidine-Cy3	44
5	Conclusion et perspectives	52
5.1	Conclusions	52
5.2	Perspectives	53

1 Introduction

Ce mémoire rassemble les résultats des travaux de recherche que j'ai menés au cours des dix dernières années au laboratoire Kastler Brossel. Après avoir soutenu ma thèse à l'automne 1996, j'ai continué à travailler sur la condensation de Bose-Einstein des gaz d'atomes froids dans l'équipe de Jean Dalibard, et ce jusqu'en 1998. J'ai alors été recruté comme Maître de Conférences à l'Université Pierre et Marie Curie. J'ai passé une année dans le groupe de Serge Haroche, année consacrée à la mise en place d'un piège magnéto-optique, source d'atomes froids destinés à être couplé au champ évanescent d'une microsphère. J'ai ensuite choisi de changer de thème de recherche, et j'ai suivi Maxime Dahan dans la création d'une nouvelle équipe de recherche au sein du laboratoire.

L'essentiel du travail décrit dans ce mémoire a été mené au sein de cette équipe, nommée "Optique et Biologie". Cette équipe a été officiellement créée à l'automne 2000, après que Maxime Dahan a été recruté au CNRS au retour d'un stage post-doctoral aux Etats-Unis. Nos travaux s'articulent autour de la détection optique de molécules individuelles, notamment pour la biologie. Nous utilisons dans ce but des sondes fluorescentes aux propriétés optiques remarquables : les nanocristaux semi-conducteurs. Maxime Dahan a rapporté des Etats-Unis les premiers nanocristaux, sur lesquels il avait travaillé, et nous nous sommes penchés sur leurs propriétés photophysiques. Nous avons ensuite utilisés les nanocristaux comme sondes fluorescentes pour la biologie. Maxime s'est particulièrement intéressé à leur utilisation en milieu vivant et a montré, en collaboration avec l'équipe d'Antoine Triller (ENS, département de Biologie), qu'ils permettent l'étude à l'échelle de la molécule individuelle de la dynamique de récepteurs membranaires neuronaux. Je me suis concentré pour ma part à une autre activité de l'équipe : la visualisation des interactions ADN-protéines. Notre approche consiste à étendre et à accrocher des molécules d'ADN à une surface en s'inspirant des techniques de peignage moléculaire développées par V. Croquette et D. Bensimon à l'ENS. Notre but est de visualiser directement par microscopie de fluorescence le mouvement le long de la molécule d'ADN d'une protéine marquée à l'aide de nanocristaux ou de colorants organiques. La proximité entre la surface et l'ADN nous permet de visualiser ce mouvement par microscopie en onde évanescente. Nous nous sommes concentrés sur l'enzyme de restriction EcoRV au cours des dernières années, et en particulier sur la "diffusion facilitée" de cette enzyme sur l'ADN étiré du bactériophage T7. Cette diffusion facilitée, proposée par les biochimistes voilà une trentaine d'années, permet aux enzymes site-spécifiques de trouver leur cible sur l'ADN avec une efficacité remarquable. Elle consiste en une diffusion le long de l'ADN, dont le mécanisme sous-jacent (glissement le long du grand sillon, sauts entre sites de l'ADN, ...) fait l'objet de débats nourris. Nous sommes parvenus à observer la diffusion d'EcoRV, marquée avec des nanocristaux, le long de l'ADN étiré. Nous avons enregistré plusieurs dizaines d'événements d'association-dissociation de l'enzyme avec l'ADN, et nous avons déterminé les trajectoires de la protéine. Nous avons déduit de nos expériences la distribution des temps d'interaction de la protéine avec l'ADN, le coefficient de diffusion de l'enzyme et la longueur explorée lors de l'interaction. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus par les biochimistes. Nous avons répété ces expériences avec des enzymes marquées avec un fluorophore plus petit, et, à partir d'arguments hydrodynamiques, nous avons montré que le glissement des protéines le long de la chaîne d'ADN est le mécanisme le plus probable qui sous-tend la diffusion facilitée d'EcoRV. Enfin, nous avons observé des sauts de l'enzyme le long de l'ADN sur des distances importantes. L'analyse de la distribution de ces sauts nous a permis de proposer une vision nouvelle de la diffusion facilitée. Une diffusion unidimensionnelle de la protéine sur quelques centaines de paires de bases permet de soigneusement tester l'ADN, site à site, et une diffusion tridimensionnelle rapide le long de

l'ADN permet à l'enzyme d'explorer des zones de l'ADN distances de plusieurs centaines à plusieurs milliers de paires de bases. Notre approche expérimentale constitue un "motility assay" pour les études des interactions ADN/protéines similaire à ceux mis en place pour l'étude des moteurs moléculaires (kinésine, myosine, . . .) se déplaçant le long de microtubules ou de filaments d'actine. Dans cette optique, nous avons développé une méthode qui nous permet de marquer de manière spécifique les extrémités de l'ADN à l'aide de nanocristaux. Il est alors possible de détecter par fluorescence des molécules d'ADN individuelles sans les marquer avec un intercalant ou un ligand du sillon, marquages qui peuvent interférer avec l'activité enzymatique.

Ces travaux sont par nature pluridisciplinaires, et ont été menés grâce à des collaborations sans lesquelles il n'aurait pas été possible d'aboutir. Jean-François Allemand (laboratoire de Physique Statistique, ENS) a guidé nos premiers pas dans le monde de la micromanipulation des molécules d'ADN. Christophe Escudé (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris) a été un acteur essentiel dans la modification de l'ADN et la détection de ses extrémités à l'aide de nanocristaux. Il est également le biologiste avec lequel des discussions fréquentes permettent d'avancer sans s'égarer. Wolfgang Wende (Université de Giessen, Allemagne) nous a fourni les protéines modifiées sans lesquelles les résultats concernant la dynamique d'EcoRV le long de l'ADN n'auraient été obtenus. Enfin, nous avons récemment mis en place une collaboration avec des théoriciens (LPTMC, UPMC) afin de proposer des modèles de diffusion facilitée qui rendent compte de nos résultats expérimentaux.

Ce manuscrit est organisé en trois parties. Dans la première partie, je présente le travail mené sur la photophysique de nanocristaux individuels. Dans la deuxième partie, j'expose les travaux consacrés à l'ADN : notre méthode d'accrochage aux surfaces, ainsi que les travaux menés en collaboration avec Christophe Escudé sur le marquage des extrémités de l'ADN à l'aide de nanocristaux et la détection de séquence courte de l'ADN. La troisième partie est consacrée aux résultats obtenus sur la dynamique de l'enzyme de restriction EcoRV en interaction avec de l'ADN étiré. Cette partie reprend les résultats obtenus par Aurélien Crut lors de sa thèse de doctorat, soutenue à l'automne 2005, et ébauche ceux que présentera Isabelle Bonnet, qui devrait soutenir sa thèse en 2007. Pour chacune des parties, je me suis efforcé de résumer les résultats obtenus et d'indiquer des questions ouvertes. Une conclusion, plus prospective, expose les projets en cours. Une liste complète des productions et activités scientifiques est également jointe.

2 Etude photophysique de nanocristaux individuels

2.1 Présentation, contexte

Les nanocristaux semi-conducteurs : une nouvelle classe d'émetteurs fluorescents

Les nanocristaux semi-conducteurs (NCs) sont une illustration des progrès spectaculaires réalisés dans la synthèse de nanomatériaux. Au cours des années 1990, plusieurs laboratoires ont mis au point des techniques de synthèse colloïdale de nanoparticules permettant d'obtenir des échantillons de grande qualité, tant par leurs propriétés optiques que par leur monodispersité en taille [1, 2, 3, 4]. Ces objets composés de quelques centaines à quelques dizaines de milliers d'atomes représentent l'équivalent en solution des boîtes quantiques auto-organisées réalisées en épitaxie par jet moléculaire et étudiées par les physiciens du solide depuis la fin des années 80 [5]. Grâce à un contrôle précis de leur taille à l'échelle nanométrique, les boîtes quantiques colloïdales permettent d'explorer la modification des propriétés physiques (optiques, électriques, structurales,...) lorsque l'on passe progressivement de l'échelle atomique à celle du matériau massif [6].

Le changement des propriétés d'émission des NCs en fonction de leur taille est certainement l'une des manifestations les plus spectaculaires des effets quantiques à l'échelle nanométrique dans ces systèmes. A cause du confinement quantique des paires électron-trou dans la structure, la longueur d'onde d'émission correspondant à leur recombinaison radiative se décale vers les basses énergies lorsque la taille du nanocristal augmente. Dans le cas du sélénure de cadmium CdSe, très fréquemment utilisé, le pic d'émission passe continument du bleu (480 nm) au rouge (650 nm), lorsque le diamètre de la particule croît de 2 à 10 nm. Afin d'augmenter leur rendement quantique, les NCs sont le plus souvent recouverts de quelques couches atomiques d'un semi-conducteur de plus grand gap. En servant de barrière de potentiel, cette coquille empêche les porteurs de charge d'être piégés à la surface. Elle réduit ainsi les processus de recombinaison non radiative et permet d'obtenir des échantillons dont le rendement de fluorescence dépasse 50 %. Pour les nanoparticules de CdSe dont l'énergie de recombinaison varie entre 1.9 et 2.6 eV suivant la taille, le matériau protecteur le plus souvent utilisé est le sulfure de zinc ZnS dont le gap dans le massif est 3.8 eV. Les résultats présentés dans ce manuscrit ont été obtenus avec des échantillons de nanocristaux cœur-coquille de CdSe/ZnS. L'ensemble des techniques de synthèse permet maintenant de préparer des chromophores inorganiques brillants, de longueur d'onde ajustable, susceptibles d'être modifiés chimiquement et pouvant être incorporés dans des environnements variés.

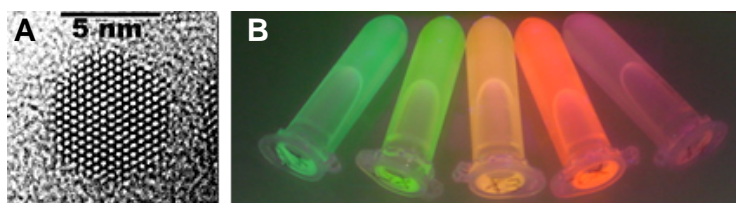


FIG. 1 – A) Structure d'un nanocristal de CdSe visualisé en microscopie électronique à transmission (cliché A. Kadavanich, laboratoire de P. Alivisatos, UC Berkeley), B) Échantillons de nanocristaux de CdSe/ZnS de taille croissante.

De manière fortuite, le développement des méthodes de synthèse de nanoparticules semiconductrices a coïncidé avec l'avènement d'un autre domaine de recherche : *la détection optique de molécules individuelles*. Initié par les travaux de W.E. Moerner et M. Orrit à la fin des années 80 [7, 8], ce champ de recherche a connu depuis un essor considérable. Les expériences, qui portaient initialement sur la spectroscopie de molécules à basse température, ont évolué progressivement vers des mesures à température ambiante puis des applications à l'étude de systèmes biologiques [9, 10]. L'un des attraits des expériences de molécules individuelles est de pouvoir sonder des propriétés qui sont habituellement moyennées dans les mesures d'ensemble. Les variations des grandeurs physiques, qu'elles résultent d'inhomogénéités au sein de l'échantillon ou de fluctuations dynamiques stochastiques, deviennent alors accessibles.

Les NCs, en tant que nouvelle classe d'émetteurs fluorescents, sont naturellement devenus objet d'étude en molécule individuelle, notamment dans le laboratoire de M. Bawendi au MIT [11]. Réalisée à l'échelle d'une seule nanoparticule, la spectroscopie optique des nanocristaux a révélé des phénomènes insoupçonnés tels que l'intermittence de fluorescence [12] ou la diffusion spectrale [13] et a mis en avant le rôle de l'environnement du nanocristal sur les modifications de ses propriétés de fluorescence. De manière générale, ces expériences ont renforcé l'image des NCs comme des quasi-atomes tout en soulignant les interactions dynamiques auxquelles ils sont soumis.

Initialement, la synthèse et l'étude des propriétés optiques des NCs étaient en partie motivées par leur utilisation à la place des molécules organiques dans des dispositifs optiques ou optoélectroniques. Dans ce but, la possibilité de les manipuler dans des solvants et de les incorporer dans de multiples environnements (polymères, gel, ...) est un avantage par rapport aux boîtes épitaxiées qui sont préparées dans une matrice solide. Au nombre des dispositifs récents, on peut ainsi citer la réalisation de diodes électroluminescentes [14, 15], de capteurs solaires [16], l'observation de l'émission laser à température ambiante et cryogénique [17, 18] ou l'incorporation de NCs dans des cristaux photoniques [19].

Des sondes pour la biologie

En 1998, les équipes de P. Alivisatos (UC Berkeley) et S. Nie (Indiana University) ont fait émerger un champ nouveau d'applications en démontrant qu'en plus de leur intérêt fondamental, les nanocristaux semi-conducteurs pouvaient être utilisés comme sondes pour la biologie [20, 21]. Leurs propriétés optiques, intermédiaires entre celles du cristal massif et celles d'atomes individuels, en font des objets très favorables pour le marquage fluorescent pour les raisons suivantes :

- A la différence des fluorophores organiques, le spectre d'absorption des NCs est très large permettant d'exciter optiquement la nanoparticule très au-dessus du gap et de filtrer efficacement l'émission de l'excitation.
- Le spectre d'émission est au contraire étroit et symétrique, sans les décalages vers le rouge dus aux niveaux vibrationnels de molécules organiques.
- Leur section efficace d'absorption est très supérieure à celle des fluorophores organiques. A rendement quantique similaire, les NCs sont donc des émetteurs particulièrement brillants.
- La photostabilité des NCs est bien supérieure à celle des molécules organiques.

L'ensemble de ces caractéristiques rend possible la détection multicolore avec une seule source d'excitation et sans effet de photoblanchiment, ouvrant des perspectives nouvelles pour

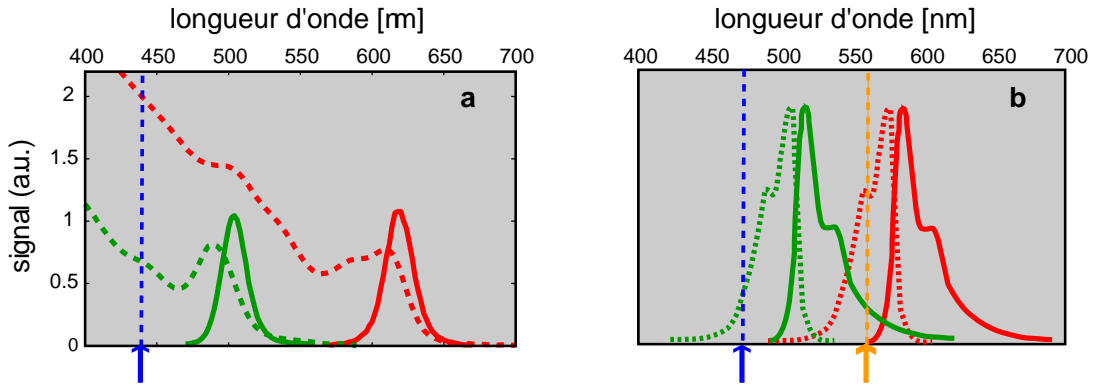


FIG. 2 – Spectres d'émission (traits pleins) et d'absorption (traits pointillés) : A) de deux échantillons de nanocristaux de CdSe/ZnS : (i) de diamètre 2.2 nm et d'émission à 500 nm (en vert), (ii) de diamètre 5.0 nm et d'émission à 620 nm (en rouge), B) de deux colorants organiques.

explorer les propriétés d'échantillons biologiques avec une grande sensibilité. Si quelques années ont été nécessaires pour que les promesses annoncées commencent à se réaliser, les utilisations des NCs en biologie sont aujourd'hui en plein essor [22, 23, 24], que cela soit pour améliorer les performances de techniques pré-existantes ou pour développer des applications entièrement nouvelles.

Enfin, des progrès spectaculaires ont été réalisés sur le contrôle de la forme des nano-objets. Au cours des dernières années, on a vu tour à tour apparaître des nanobatonnets semiconducteurs [25], des tétrapodes [26], des nanofils [27], des nanosphères creuses [28] ou des nanomatériaux hybrides or-semiconducteur [29]. L'intérêt pour la biologie a été suggéré dans certains cas, comme par exemple pour les mesures d'orientation avec des nanobatonnets [30] ou la détection électrique de virus avec des nanofils [27]. Dans bien d'autres cas, la possibilité et l'utilité d'intégrer ces nanoparticules dans des expériences impliquant des systèmes biologiques restent plus hypothétiques. Ces nano-objets sont pourtant un sujet de fascination qui laisse une grande part à l'imagination.

Une photophysique riche

Au cours des années 90, de multiples expériences ont démontré que l'étude de molécules fluorescentes à l'échelle de l'objet unique révélait des processus photophysiques nouveaux tels que des fluctuations spontanées d'intensité, de position spectrale ou de durée de vie des émetteurs [7, 8]. De par leur nature aléatoire, ces fluctuations sont rapidement moyennées dans des mesures d'ensemble et restent ainsi cachées dans des expériences conventionnelles. Tant d'un point de vue fondamental que du point de vue des applications en biologie, il est essentiel de comprendre les caractéristiques des sondes fluorescentes utilisées afin de distinguer ultérieurement les effets liés à leurs propriétés intrinsèques de ceux liés aux molécules auxquelles on souhaite les attacher.

Pour ces raisons, nous nous sommes intéressés à plusieurs propriétés de l'émission de NCs semiconducteurs individuels et nous présentons ici les résultats obtenus sur l'intermittence de la fluorescence et le dégroupement de photons de fluorescence. Ces expériences sont décrits plus en détail dans la thèse de X. Brokmann [31]. Cette thèse expose de plus d'autres aspects de la photophysique des NCs, comme la mesure de l'orientation de nanocristaux individuels et l'étude résolue en temps des recombinaisons radiative et non radiative.

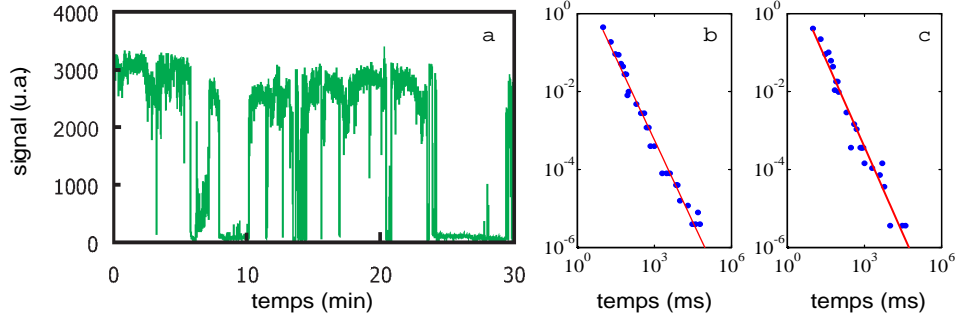


FIG. 3 – a) Intermittence de la fluorescence d'un nanocristal unique, b) densité de probabilité P_{on} , c) densité de probabilité P_{off} .

2.2 Intermittence de la fluorescence et vols de Lévy

Observé individuellement, un nanocristal est un objet fluorescent intermittent [12] : l'intensité émise alterne de manière aléatoire entre des phases d'allumage et d'extinction pour lesquelles on collecte un très faible nombre de photons (fig. 3a). Cette intermittence (également appelée clignotement) est un phénomène récurrent dans l'étude d'émetteurs fluorescents et a été observée dans une large gamme de systèmes : protéines fluorescentes [32], fluorophores organiques [33], agrégats métalliques [34], polymères fluorescents [35], nanotubes de carbone [36], nanocristaux de CdTe [37], de InAs [38], de Si [39]... A une échelle microscopique, l'origine de l'intermittence n'est pas entièrement élucidée et dépend sans doute de la nature du système étudié. Avant d'en discuter brièvement les causes possibles dans le cas des NCs, nous présentons l'approche développée en collaboration avec J.-P. Bouchaud (CEA) pour décrire les propriétés statistiques du clignotement [46].

Du fait de leur photostabilité, il est possible d'observer des nanocristaux individuels pendant des durées atteignant ou dépassant plusieurs dizaines de minutes. Les distributions P_{on} et P_{off} des durées des phases d'allumage et d'extinction peuvent ainsi être mesurées précisément. Il s'avère que ces distributions correspondent à des lois de puissance $1/t^{1+\mu}$ avec des exposants $\mu < 1$ (fig. 3b et 3c) [37, 40, 41]. De telles lois, souvent appelées “statistiques de Lévy” ou lois “larges”, ont des propriétés particulières telles que l'absence de valeur moyenne $\langle t \rangle$. Elles diffèrent ainsi des lois “étroites” pour lesquelles $\langle t \rangle$ est définie. Ces statistiques anormales ont été largement étudiées au LKB dans le groupe “Atomes Ultra-froids” par C. Cohen-Tannoudji pour décrire les propriétés du refroidissement subrecoil [42]. Au cours de sa thèse, Maxime Dahan a participé à ce travail [43] et a été ainsi sensibilisé aux caractéristiques inhabituelles des processus de Lévy, ce qui a sans doute accéléré les études menées dans l'équipe.

Dans le cas des NCs, nous avons développé une description purement statistique de la fluorescence formellement semblable à celle de marches aléatoires ou de phénomènes de persistance en physique statistique [42, 45]. Un nanocristal est décrit comme un système à deux états, allumé (“on”) ou éteint (“off”), dont on cherche à analyser les fluctuations temporelles. A partir de chaque mesure de l'intensité d'un nanocristal individuel, on déduit une séquence temporelle :

$$\{\tau_{\text{on}}^{(1)}, \tau_{\text{off}}^{(1)}, \tau_{\text{on}}^{(2)}, \tau_{\text{off}}^{(2)}, \dots, \tau_{\text{on}}^{(n)}, \tau_{\text{off}}^{(n)}\} \quad (1)$$

correspondant aux durées successives des périodes “on” et “off”. Les exposants μ_{on} et μ_{off} des lois

de puissance que nous avons ainsi déterminées valent respectivement 0.58 (0.17) and 0.48 (0.15), en accord avec des mesures précédentes [37, 40, 41].

Notre analyse porte sur les propriétés statistiques de ces séquences et fait appel à la théorie statistique du renouvellement. Cette théorie est fréquemment employée pour décrire par exemple les phénomènes de panne de composants et dépend de la statistique temporelle des processus étudiés [44]. Initialement développée pour des lois étroites, elle a été récemment étendue au cas des lois larges [45] pour lequel les prédictions sont largement modifiées.

D'un point de vue expérimental, notons que nous avons disposé de trajectoires individuelles, enregistrées pour un grand nombre de nanoparticules, qui peuvent être ultérieurement moyennées pour "reconstruire" les valeurs d'ensemble. Dans les mesures menées sur des NCs, il est ainsi possible de tester directement le lien, central dans la notion d'ergodicité, entre moyenne temporelle et moyenne d'ensemble. Ceci n'était pas possible dans les expériences de refroidissement laser pour lesquelles les mesures portaient simultanément sur un grand nombre d'atomes.

Caractéristique fondamentale des lois larges

Considérons un échantillon $\{\tau_i\}_{1 \leq i \leq n}$ de n variables aléatoires indépendantes provenant d'une distribution statistique $f(\tau)$. Si f est une loi étroite, la plus grande valeur de l'échantillon τ^{\max} s'écarte peu de la valeur moyenne $\langle \tau \rangle$. Par exemple, pour la loi exponentielle $ae^{-a\tau}$ (de moyenne $1/a$), τ^{\max} est de l'ordre de $\log(n)/a$. A contrario, pour une loi de puissance $t_0^\mu/t^{1+\mu}$ ($\mu < 1$), τ^{\max} est de l'ordre de $\Theta(n) = \sum_1^n \tau_i$ la somme de toutes les variables aléatoires. La somme $\Theta(n)$ peut être évaluée au moyen du théorème centrale limite généralisé qui stipule que la variable réduite $\Theta(n)/t_0 n^{1/\mu}$ est distribuée suivant une loi de Lévy de paramètre μ [42]. Ainsi, au lieu de varier comme n , Θ croît plus rapidement en $n^{1/\mu}$.

Le fait que τ^{\max} soit comparable à Θ peut être observé expérimentalement en traçant $\Theta(n)$ en fonction de n . Ceci fait apparaître une figure désignée parfois par le terme d' "escalier du diable" (en anglais "devil's staircase") : chaque décrochement brusque correspond à un évènement dont la durée est comparable à la durée totale (fig. 4a). Cette caractéristique essentielle des lois larges permet d'appréhender qualitativement bon nombre de leurs propriétés. Puisque l'évènement dominant a une durée de l'ordre de la durée totale de l'expérience, cela signifie que :

- les propriétés statistiques du processus temporel vont évoluer au cours du temps et cela même si la loi génératrice est stationnaire. Il apparait ainsi de manière implicite l'idée de *vieillesse statistique* dans la dynamique du système.
- il n'existe pas d'échelle de temps typique sur laquelle effectuer une moyenne temporelle que l'on pourrait comparer à une moyenne d'ensemble. La question de l'*ergodicité* du système se pose donc naturellement.

Vieillesse statistique

Pour illustrer le phénomène de vieillissement statistique, on considère $s(t)$ la densité de probabilité qu'un NC bascule d'un état éteint à un état allumé après avoir passé le temps t dans un état éteint. Dans le cas d'une loi étroite, $s(t)$ est constante et égale à $1/\langle t \rangle$. Pour une loi large, la situation change radicalement : $s(t)$ décroît avec le temps comme $t^{\mu_{\text{off}}-1}$ [42]. En d'autres termes, $s(t)$ dépend du temps préalablement passé dans l'état noir. Nous avons testé expérimentalement cette prédiction et trouvé un bon accord entre la décroissance expérimentale en $t^{-0.5}$ et la valeur attendue d'après notre détermination de μ_{off} (fig. 4b).

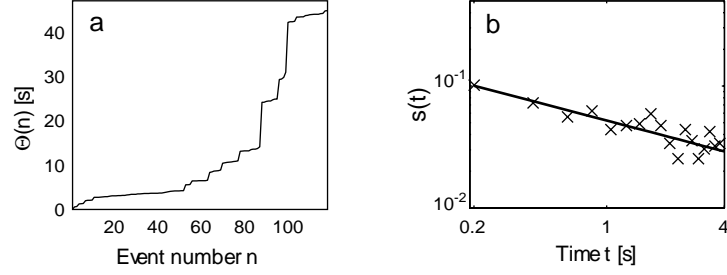


FIG. 4 – a) “Devil’s staircase”; b) Densité de probabilité $s(t)$ pour qu’un NC bascule d’un état “on” à un état “off” après avoir passé un temps t dans l’état éteint.

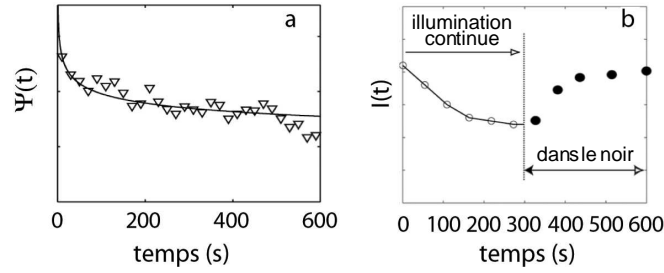


FIG. 5 – a) Fraction $\Phi(t)$ de NCs dans l’état “on” à l’instant t . La courbe en trait plein correspond à une décroissance en $1/t^{0.13}$; b) Sous illumination continue, la fluorescence de l’échantillon diminue progressivement. Lorsque celui-ci est laissé dans le noir, la fluorescence (sondée pendant 100 ms toutes les minutes) revient à son niveau initial.

Evolution de l’intensité de fluorescence d’un ensemble de nanocristaux

L’effet de vieillissement statistique a des conséquences importantes sur l’interprétation de grandeurs aussi élémentaires que l’intensité $I(t)$ émise par un ensemble de nanocristaux. Considérons par exemple la fraction $\Phi(t)$ de NCs dans l’état “on” à l’instant t . Si on fait l’hypothèse que tous les nanocristaux émettent avec la même intensité, $\Phi(t)$ est simplement proportionnel à $I(t)$.

Dans le cas de lois étroites, le système est à l’équilibre à tout instant. $\Phi(t)$ ne dépend pas de t et est égal à $\langle \tau_{\text{on}} \rangle / (\langle \tau_{\text{on}} \rangle + \langle \tau_{\text{off}} \rangle)$. Dans le cas de lois larges, $\Phi(t)$ dépend des temps $\Theta_{\text{on}}(n) = \sum_1^n \tau_{\text{on}}^i$ et $\Theta_{\text{off}}(n) = \sum_1^n \tau_{\text{off}}^i$ passés respectivement dans les états “on” et “off” et donc des valeurs relatives des exposants μ_{on} et μ_{off} . Ainsi, pour $\mu_{\text{on}} > \mu_{\text{off}}$, le temps passé dans l’état éteint augmente plus rapidement avec le nombre d’allumage n . Θ_{off} va ainsi finir par dominer et l’intensité de fluorescence va décroître. On montre plus précisément que $\Phi(t)$ varie comme $t^{-(\mu_{\text{on}} - \mu_{\text{off}})}$ [42].

Nous avons testé expérimentalement cette prédiction et avons mesuré une décroissance en $t^{-0.13}$ en accord avec les mesures des exposants μ_{on} et μ_{off} (fig; 5a). Nous avons également observé que cette décroissance est réversible : après une illumination continue pendant 10 minutes, si on éteint le laser et on laisse l’échantillon dans le noir pendant 10-15 minutes, on récupère le niveau initial de la fluorescence (fig; 5b). Ce résultat important indique qu’une décroissance de

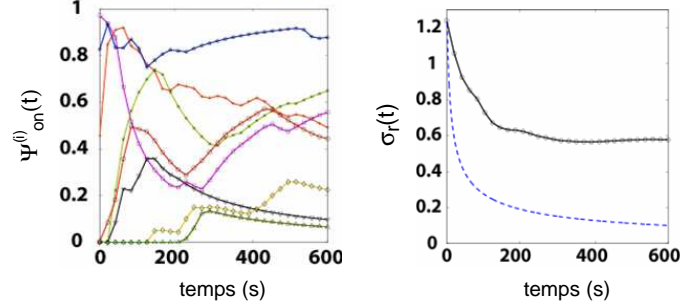


FIG. 6 – a) Exemple pour 8 trajectoires de la variation temporelle de $\Psi_{\text{on}}^i(t)$, la fraction passée dans l'état “on” entre 0 et t , b) Ecart quadratique $\sigma_r(t)$ de la distribution des $\Psi_{\text{on}}^i(t)$ relatif à la valeur moyenne ($\sigma_r(t)$ est calculé à partir de 230 trajectoires). La courbe en pointillés correspond à la décroissance de $\sigma_r(t)$ attendue lorsque l'intermittence est gouvernée par des lois étroites.

la fluorescence n'a pas nécessairement comme origine un processus irréversible tel que la photodestruction, mais peut avoir pour cause des fluctuations temporelles entre deux états. Des observations récentes suggèrent qu'un tel effet puisse également jouer un rôle dans le photoblanchiment d'autres émetteurs fluorescents (fluorophores, GFP, . . .) [47, 48, 49].

Non-ergodicité

Pour illustrer la différence entre moyenne temporelle et moyenne d'ensemble, nous avons comparé la fraction $\Psi(t)$ de NCs dans l'état allumé à l'instant t à $\Psi_{\text{on}}^i(t)$, la fraction du temps passé dans l'état allumé entre 0 et t pour le i^{eme} NC. On observe expérimentalement que les valeurs $\Psi_{\text{on}}^i(t)$ ne convergent pas vers $\Psi(t)$ (fig ; 6a). Au contraire, elles fluctuent largement, avec un écart quadratique de l'ordre de l'unité (fig ; 6b). Moyenne temporelle et moyenne d'ensemble ne coïncident donc pas, fournissant une manifestation explicite de la non-ergodicité du système.

Origine de l'intermittence

Si la nature des mécanismes d'intermittence des NCs n'est pas encore entièrement élucidée, plusieurs aspects sont cependant bien établis. Plusieurs approches ont permis de montrer que le passage d'un état “on” à un état “off” correspond à une ionisation du nanocristal [50, 51]. Cette ionisation a lieu par transfert tunnel de l'électron (ou du trou) vers un état piège accepteur à la surface de la particule. Dans ce mécanisme, la distribution en loi de puissance des durées “on” provient de reconfigurations dynamiques de l'environnement de la nanoparticule [31]. La neutralisation ultérieure du NC résulte de la réinjection, par effet tunnel résonnant, d'un électron par un piège donneur avec un taux de couplage $k \propto e^{-d/\lambda}$ (λ est la longueur tunnel du porteur dans le piège). Si on fait l'hypothèse que la densité de probabilité de distance tunnel d varie exponentiellement $e^{-d/\delta}$, alors la durée des états “off” est distribuée suivant une loi de puissance $1/\tau^{1+\mu}$ avec $\mu = \lambda/\delta$.

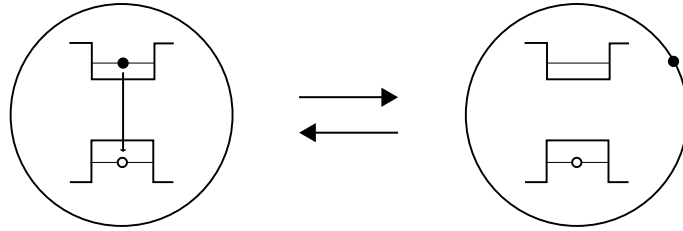


FIG. 7 – L’intermittence résulte de passages entre un état neutre (“on”) et un état ionisé (“off”).

Pour autant que cette discussion soit compatible avec certaines observations expérimentales, de nombreux points restent à préciser. Il n’est notamment pas clair de savoir pourquoi les exposants mesurés sont presque toujours de l’ordre de $1/2$, quelque soit l’échantillon utilisé ou l’équipe ayant réalisé les expériences. On ne peut donc exclure qu’un mécanisme plus “universel” sous-tende les caractéristiques de l’intermittence de la fluorescence, indépendamment des détails microscopiques du système. Une étude expérimentale plus approfondie nécessiterait de sonder précisément l’environnement des nanoparticules afin d’en corrélérer les propriétés avec la fluorescence mesurée mais ceci reste en pratique difficile à réaliser. Un autre point qui n’est pas décrit par ce modèle d’ionisation concerne l’apparition de troncature dans la distribution des durées “on” : lorsqu’on augmente l’intensité d’excitation, la distribution P_{on} tend à décroître plus vite qu’une loi de puissance au temps long ($> 1-10$ s) [31], sans toutefois correspondre à une loi exponentielle.

Signalons pour terminer qu’un papier récent [52] a montré qu’il était possible de diminuer, sinon d’éliminer, les phénomènes de scintillement *in vitro* en rajoutant en solution une haute concentration (10 à 100 mM) d’un agent réducteur tel que le beta-mercaptoéthanol ou le dithiothreitol (DTT) dont l’effet serait de remplir les pièges électroniques en surface de la particule et de réduire ainsi les possibilités d’ionisation photoinduite. Le groupe de S. Xie à Harvard a également indiqué avoir observé une suppression du scintillement pour des NCs dans des compartiments endosomaux de cellules vivantes, peut-être due à une forte concentration locale de cystéine ou d’histidine.

2.3 Dégrouperement de la fluorescence

Notre équipe, de manière concomitante à d’autres groupes [53, 54], a effectué des mesures de dégrouperement de la fluorescence sur des NCs individuels. Le grand nombre de photons collectés permet d’obtenir des données avec un très bon signal sur bruit. Nous avons d’abord effectué ces mesures en excitation continue et observé un “antibunching” dépassant 99 % à température ambiante (fig. 8a) [55]. A la différence des boîtes quantiques épitaxiées, il n’y a pas d’émission bi-excitonique, ce qui évite notamment de sélectionner spectralement les photons. Les NCs sont ainsi de bons candidats pour la réalisation de sources de photons uniques, notamment importantes pour la cryptographie quantique. La poursuite de cette étude a été réalisée avec J.-P. Hermier (équipe “Optique Quantique” du LKB) en étendant ces mesures à une excitation pulsée [59, 60]. Une caractérisation précise du taux de collection de la fluorescence a permis de démontrer notamment que la probabilité de détection d’un photon par impulsion d’excitation atteint 3 % dans le cas des NCs, résultat comparable ou supérieur à ceux obtenus avec d’autres sources de photons uniques (atomes, fluorophores organiques, boîtes quantiques épitaxiées, centres colorés du diamant, . . .).

La mesure de la fonction d'autocorrélation $g^{(2)}(t)$, qui présente un dégroupement de photons ($g^{(2)}(t) < 1$) caractéristique aux temps courts ($t \leq 100$ ns), fait aussi apparaître des phénomènes de groupement de photons ($g^{(2)}(t) > 1$) aux temps longs (de la μ s à plusieurs dizaines de minutes). Ces phénomènes de groupement sont directement liés au scintillement et aux statistiques de Lévy. Nous avons pu mesurer la fonction de corrélation d'un nanocristal unique sur presque 12 ordres de grandeurs, donnant une image complète des fluctuations de l'émetteur (fig. 8b). Nous avons également mis en évidence la non-stationnarité de la fonction d'autocorrélation mais sans en faire une description quantitative [55]. Plusieurs études théoriques ont été menées depuis sur ce sujet [58] et fournissent aujourd'hui une description analytique des propriétés de la fonction d'autocorrélation temporelle dans le cas de lois larges.

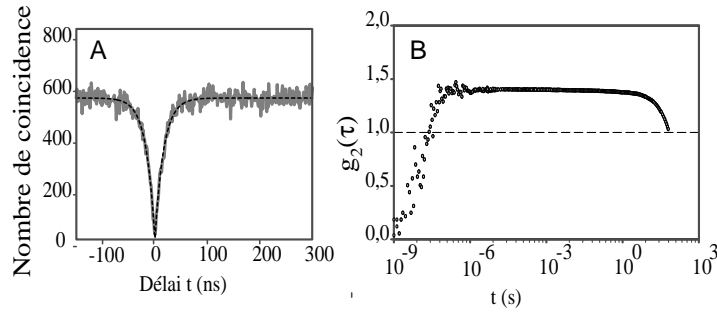


FIG. 8 – *Fonction de corrélation de l'intensité de fluorescence d'un nanocristal individuel. A) Dégroupement de photons en excitation continue. B) $g^{(2)}(t)$ sur 12 ordres de grandeurs.*

Bunching and antibunching in the fluorescence of semiconductor nanocrystals

G. Messin, J. P. Hermier, E. Giacobino, P. Desbiolles, and M. Dahan

Laboratoire Kastler Brossel, Ecole Normale Supérieure et Université Pierre et Marie Curie,
24, Rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France

Received June 25, 2001

The fluorescence of single-colloidal CdSe quantum dots is investigated at room temperature by means of the autocorrelation function over a time scale of almost 12 orders of magnitude. Over a short time scale, the autocorrelation function shows complete antibunching, indicating single-photon emission and atomiclike behavior. Over longer time scales (up to tens of seconds), we measure a bunching effect that is due to fluorescence intermittency and that cannot be described by fluctuations between two states with constant rates. The autocorrelation function also exhibits nonstationary behavior related to power-law distributions of ON and OFF times. © 2001 Optical Society of America

OCIS codes: 270.5290, 030.5260, 180.1790.

The realization of single-photon sources and generation of nonclassical states of light is of great interest in quantum optics, especially in quantum cryptography, where secure transmission requires that one and only one photon be sent at a given time.¹ To obtain a single-photon source, one should use the fluorescence emission of single-quantum systems, and several potential sources have already been studied. Antibunching has been observed in the fluorescence of atoms,^{2,3} organic molecules,^{4–6} AlGaAs quantum dots (QDs),^{7,8} and single nitrogen vacancy centers.^{9,10} Colloidal CdSe–Zns QDs have also attracted much attention, since they can be used at room temperature, present remarkable photostability, and have a high quantum efficiency. Michler *et al.*¹¹ and Lounis *et al.*¹² recently showed that the fluorescence light of such QDs exhibits partial or complete antibunching. However, the fluorescence emission of QDs is known to exhibit intermittency¹³ resulting from physical mechanisms that remain to be fully elucidated. In this Letter the photophysical properties of individual QDs are investigated over a large time scale (from nanoseconds to tens of seconds) by use of the autocorrelation function (ACF), providing a more-comprehensive description of QDs as light emitters.

We prepared the samples by spin coating a nanomolar solution of QDs (1.8-nm radius, 570-nm peak emission) in butanol and a thin film of poly methyl(methacrylate) on a glass coverslip. The excitation light comes from the 514-nm line of a cw Ar⁺ laser whose beam is focused to the diffraction limit (waist, ~300 nm) by a high-N.A. objective (Apochromat; N.A., 1.4; oil immersion) of a confocal microscope. The fluorescence photons are collected by the same objective and sent to a high-sensitivity Hanbury-Brown–Twiss detection scheme composed of a 50/50 nonpolarizing beam splitter followed by two (start and stop) single-photon avalanche photodiodes. The pulses from the photodiodes are simultaneously sent to various data acquisition systems. First, a picosecond time analyzer (PTA; EG&G 9138) pro-

vides histograms of time delays between photons for delays ranging from hundreds to tens of microseconds. The PTA functions similarly to a conventional time–amplitude converter, except that it registers all the stop events during a time interval triggered by a start pulse and gives direct access to the ACF. To investigate negative correlation times, we introduce a constant delay (~200 ns) in the stop channel. The single-photon avalanche photodiode pulses are sent in parallel to a correlator (Malvern 7932) that calculates the ACF for delays greater than 1 μs. Finally, the absolute arrival time of each detected photon is recorded by a counting board with a 12.5-ns time resolution.

The normalized ACF of the fluorescence intensity is a tool suited to exploration of emission properties over large time scales. It is defined as

$$g^{(2)}(t, t + \tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle \langle I(t + \tau) \rangle}, \quad (1)$$

where $I(t)$ is the fluorescence intensity and $\langle \rangle$ indicates ensemble averaging. In practice, this quantity is calculated by use of time averaging, with implicit assumptions of ergodicity and stationarity. As explained below, calculating this quantity is of great importance in our measurements. Both the PTA and the correlator give the number of coincidence counts, $n(\tau)$, as a function of the time delay between photons. The normalized ACF can be deduced by calculation of $g^{(2)}(\tau) = n(\tau)/I_A I_B \Delta t T$, where I_A and I_B are the mean intensities on the start and stop channels, Δt is the time resolution, and T is the total acquisition time.

A histogram of the coincidence counts on a short time scale given by the PTA shows a dip centered at $\tau = 0$ (Fig. 1). The antibunching of the fluorescence finds its origin in the quantum nature of the emitter: A QD in its ground state needs to absorb an excitation photon before spontaneously emitting a fluorescence photon. Since both these processes take a finite time, two photons cannot be emitted simultaneously. The dip can be described by an exponential curve $a[1 - b \exp(-|\tau|/\tau_0)]$. For

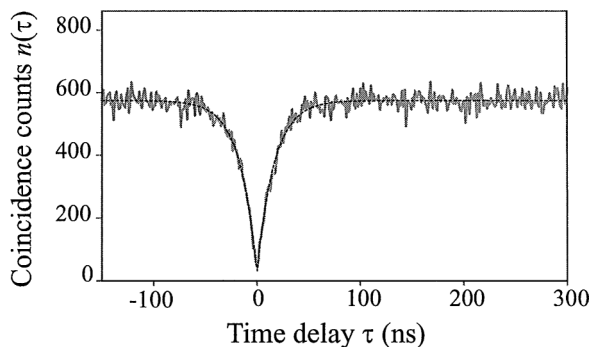


Fig. 1. Histograms of coincidence counts obtained from the PTA (time resolution, 600 ps) and corrected from the time delay. The solid curve is a fit by an exponential curve $a[1 - b \exp(-|\tau|/\tau_0)]$, with $a = 577.5$, $b = 0.95$, and $\tau_0 = 20.1$ ns.

an excitation intensity I well below the saturation limit ($20\text{--}80$ kW/cm²),¹² the value of τ_0 is essentially determined by the excited-state lifetime. In our experiments, it is found to be 17.5 (2.0) ns, similar to direct lifetime measurements. In contrast with Michler *et al.*,¹¹ but in agreement with Lounis *et al.*,¹² we found that the measured value of b usually exceeds 0.9, independently of the excitation power. When it is corrected from the background noise that is due to scattered excitation light,¹⁰ the amplitude is even greater than 0.99.

This complete antibunching is a clear indication of single-particle measurement, since two (or more) independent QDs would emit uncorrelated photons and contribute to the histogram at $\tau = 0$. As we repeatedly observed, this complete antibunching is the only non-ambiguous criterion, rather than fluorescence intermittency, for experiments at the single QD level. In our experiments, for I of ~ 1 kW/cm², we could collect up to 30×10^6 photons with average detected emission rates of $10\text{--}30$ kHz. Compared with single molecules at room temperature,⁶ QDs appear to be superior in terms of the number of emitted photons before photodegradation. In addition, the large absorption spectra of QDs make them compatible with a pulsed blue laser diode, opening the way to compact single-photon sources.

The stability of such a source over time is an issue that has seldom been addressed so far. It has been repeatedly observed that QDs exhibit fluorescence intermittency, possibly because of Auger ionization, after creation of multiple electron-hole pairs.^{13,14} This effect manifests itself as an alternation of bright (ON) and dark (OFF) periods with durations of up to tens of seconds.

To link short- and long-term behavior, we measured the ACF from hundreds of picoseconds to tens of seconds. We obtained this time scale, which is to our knowledge unprecedentedly large, by joining the normalized data from the PTA and the correlator without any further adjustment (Fig. 2). The ACF is nearly constant from 100 ns to 100 μ s, with a value of a_{norm} that indicates an absence of intermittency on this time scale. To a good approximation, $1/a_{\text{norm}}$ represents the fraction of time spent by the emitter in the ON state.

Beyond 100 μ s, the ACF decreases slowly over several time scales before falling more abruptly at a time close to the measurement duration, T . Strikingly, we do not observe a time scale over which the ACF reaches an asymptotic value of 1, even for measurements with a duration of more than 1000 s.

To grasp this particular observation fully, it is useful to compare it with a two-state model in which a system jumps back and forth between an ON and OFF states with constant rates, k_{on} and k_{off} , respectively. Such a model, often employed to represent the fluctuations of fluorescent systems, successfully describes, for instance, bunching in organic molecules as a result of shelving in the triplet state.⁵ In this case, the ACF is stationary and $g^{(2)}(t)$ varies as $1 + [(1 - p)/p] \exp(-t/t_0)$, where $t_0 = 1/(k_{\text{on}} + k_{\text{off}})$ and $p = k_{\text{off}}/(k_{\text{on}} + k_{\text{off}})$. This exponential decay from $1/p$ to 1 implies that, for t much larger than the characteristic time scale t_0 , the ACF is constant (equal to 1). Efros and Rosen actually developed a model for the fluorescence of individual QDs that leads to this kind of behavior.¹⁴

Our ACF measurements cannot be described by an exponential decay. To understand the origin of this discrepancy, we considered the intensity time trace obtained by binning the incoming pulses [Fig. 3(a)]. We obtained the distributions of ON and OFF periods by setting a threshold (equal to a couple of times the background signal) and comparing the intensity with this value. Instead of following exponential laws (as would be the case in the two-state model), the densities of probability of ON and OFF periods, calculated for more than 100 individual QDs, exhibit a power-law dependence $1/t^{1+\mu}$, with μ in the range 0.3–0.7.¹⁵ The origin of this dependence, first observed and discussed by Kuno *et al.* for OFF times,¹⁶ has yet to be understood fully. However, its occurrence has several consequences for the shape and the meaning of the ACF.

Since they have no mean values and are dominated by fluctuations, power-law distributions with exponents $1 + \mu$ smaller than 2 stand apart from conventional statistical laws.^{17,18} Because of the long tails of these broad distributions, events with a duration of the order of the acquisition time are likely to occur, as is visible in the trace in Fig. 3(a). Consequently, there is no characteristic time scale over which the fluorescence intensity can be averaged. A stochastic process driven by a broad distribution,

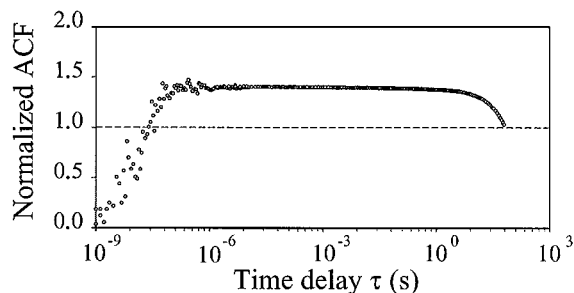


Fig. 2. Normalized ACF from 1 ns to 100 s, measured by the PTA and the Malvern correlator ($T = 900$ s, $I = 2$ kW/cm², $a_{\text{norm}} = 1.4$).

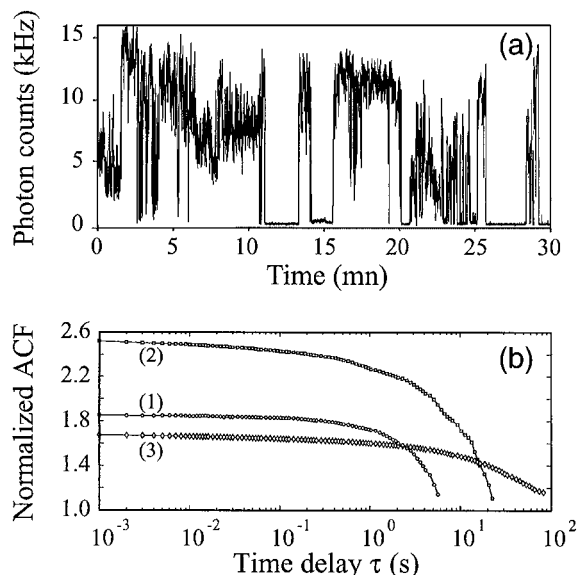


Fig. 3. (a) Time trace of the fluorescence intensity for a single QD (excitation intensity, 0.25 kW/cm^2). (b) Computations of the ACF for this trace. Curves (1), (2), and (3) correspond to time intervals of 18, 180, and 1800 s.

often designated as a Lévy flight, is intrinsically nonergodic: Ensemble and temporal averaging do not coincide.

This interpretation allows us to explain qualitatively the results of our ACF measurements. Since longer and longer ON and OFF events appear as the acquisition time increases, the value of the fraction of time spent in the ON state in the range $0-T$ (and consequently a_{norm}) does not reach an asymptotic value. The existence of ON and OFF times that are comparable to T also explains why the decay of the ACF always occurs on a time scale of the order of the measurement time. Both these properties are illustrated in Fig. 3(b). A significant and nonmonotonic change in the value at short time ($\sim 1 \text{ ms}$) as well as a progressive shift in the characteristic decay time can be observed. This effect is not due to statistical dispersion but is related to the sampling of the power laws during the particular time intervals. In contrast, for a two-state model, increasing the measurement time leads to a better single-to-noise ratio but does not induce any significant change of the ACF.

The nonergodicity induced by broad distributions implies that the temporal ACF does not equal the ensemble value. In particular, the ACF cannot be directly compared with recent analytical calculations of the ensemble correlation function.¹⁹ Nevertheless, the correlation measurements remain an appropriate tool for the study of fluorescence antibunching. Since the time scales of the fluorescence cycles (well below $100 \mu\text{s}$) and the intermittency are strongly decoupled, the coincidence histogram remains valid (and hence the values of b and τ_0). However, the normalized value a_{norm} has no general significance, as it depends critically on the acquisition time.

In conclusion, we have studied the fluorescence of single-colloidal quantum dots, using the ACF. At short time scales, we observed complete antibunching, demonstrating that, even though they have a crystalline structure, the emission properties of individual QDs are those of two-level atoms. At large time scales, because of the power-law dependence of the distributions of ON and OFF periods, QDs cannot be treated as stationary systems, meaning that standard analysis of the ACF should be used with care. This study also raises questions about the interpretation of single-molecule experiments when one is dealing with nonergodic systems.

M. Dahan's e-mail address is maxime.dahan@lkb.ens.fr.

References

1. D. Bouwmeester, A. Ekert, and A. Zeilinger, *The Physics of Quantum Information* (Springer-Verlag, Berlin, 2000).
2. H. J. Kimble, M. Dagenais, and L. Mandel, *Phys. Rev. Lett.* **39**, 691 (1977).
3. F. Diedrich and H. Walther, *Phys. Rev. Lett.* **58**, 203 (1987).
4. T. Basche, W. E. Moerner, M. Orrit, and H. Talon, *Phys. Rev. Lett.* **69**, 1516 (1992).
5. L. Fleury, J. M. Segura, G. Zumofen, B. Hecht, and U. P. Wild, *Phys. Rev. Lett.* **84**, 1148 (2000).
6. B. Lounis and W. E. Moerner, *Nature* **407**, 491 (2000).
7. P. Michler, A. Kiraz, C. Becher, W. V. Schoenfeld, P. M. Petroff, L. Zhang, E. Hu, and A. Imamoglu, *Science* **290**, 2282 (2000).
8. C. Santori, M. Pelton, G. Solomon, Y. Dale, and Y. Yamamoto, *Phys. Rev. Lett.* **86**, 1502 (2001).
9. C. Kurtsiefer, S. Mayer, P. Zarda, and H. Weinfurter, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 290 (2000).
10. R. Brouri, A. Beveratos, J. P. Poizat, and P. Grangier, *Opt. Lett.* **25**, 1294 (2000).
11. P. Michler, A. Imamoglu, M. D. Mason, P. J. Carson, G. F. Strouse, and S. K. Buratto, *Nature* **406**, 968 (2000).
12. B. Lounis, H. A. Bechtel, D. Gerion, A. P. Alivisatos, and W. E. Moerner, *Chem. Phys. Lett.* **329**, 399 (2000).
13. M. Nirmal, B. Dabbousi, M. G. Bawendi, J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, and L. E. Brus, *Nature* **383**, 802 (1996).
14. A. L. Efros and M. Rosen, *Phys. Rev. Lett.* **78**, 1110 (1997).
15. These data, not shown here, will be discussed and analyzed in detail in a forthcoming paper entitled "Lévy flight approach to fluorescence intermittency in semiconductor nanocrystals."
16. M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, and D. J. Nesbitt, *J. Chem. Phys.* **112**, 3117 (2000).
17. J. P. Bouchaud and A. Georges, *Phys. Rep.* **195**, 125 (1990).
18. F. Bardou, J. P. Bouchaud, A. Aspect, and C. Cohen-Tannoudji, *Lévy Statistics and Laser Cooling* (Cambridge U. Press, Cambridge, 2001).
19. C. Godreche and J. M. Luck, *J. Stat. Phys.* **104**, 489 (2001).

Statistical Aging and Nonergodicity in the Fluorescence of Single Nanocrystals

X. Brokmann,¹ J.-P. Hermier,^{1,2} G. Messin,¹ P. Desbiolles,¹ J.-P. Bouchaud,³ and M. Dahan¹

¹Laboratoire Kastler Brossel,* 75231 Paris Cedex 05, France

²Pôle Matériaux et Phénomènes Quantiques, Université Denis Diderot, 2, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France

³Service de Physique de l'Etat Condensé, Commissariat à l'Énergie Atomique, Orme des Merisiers, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

(Received 8 November 2002; published 26 March 2003)

The relation between single particle and ensemble measurements is addressed for semiconductor CdSe nanocrystals. We record their fluorescence at the single molecule level and analyze their emission intermittency, which is governed by unusual random processes known as Lévy statistics. We report the observation of statistical aging and ergodicity breaking, both related to the occurrence of Lévy statistics. Our results show that the behavior of ensemble quantities, such as the total fluorescence of an ensemble of nanocrystals, can differ from the time-averaged individual quantities, and must be interpreted with care.

DOI: 10.1103/PhysRevLett.90.120601

PACS numbers: 05.40.Fb, 78.67.Bf

The relation between single particle and ensemble measurements is at the core of statistical physics. It is usually expressed in terms of the ergodic hypothesis which states that time averaging and ensemble averaging of an observable coincide [1,2]. This question has attracted renewed attention given that experiments are now able to resolve individual nanometer-sized systems. It is addressed here for semiconductor CdSe nanocrystals. The fluorescence properties of these colloidal quantum dots (QDs) have raised great interest due to their size-induced spectral tunability, high quantum yield, and remarkable photostability at room temperature [3], all of which make QDs a promising system for biological labeling [4], single-photon sources [5], and nanolasers [6].

When studied at the single molecule level, CdSe QDs share with a large variety of other fluorescent nanometer-sized systems [7–10] the property of exhibiting fluorescence intermittency [11]. This means that the fluorescence intensity randomly switches from bright (“on”) states to dark (“off”) states under continuous excitation. Although the very origin of the intermittency for CdSe QDs remains a matter of investigation, its statistical properties have been studied. For a given QD, the durations τ_{on} and τ_{off} of the on and off periods follow slowly decaying power-law distributions $P_{\text{on}}(\tau_{\text{on}} > \tau) = (\tau_0/\tau)^{\mu_{\text{on}}}$, $P_{\text{off}}(\tau_{\text{off}} > \tau) = (\tau_0/\tau)^{\mu_{\text{off}}}$, where μ_{on} and μ_{off} are close to 0.5 [12,13]. This behavior extends over several orders of magnitude, from the detection integration time τ_0 up to hundreds of seconds, with very small dependence on temperature or excitation intensity.

The crucial point for our analysis is that both μ_{on} and μ_{off} are smaller than 1. In this case, the decay is so slow that the mean value of P_{on} and P_{off} is formally infinite, and very long events tend to dominate the fluorescence signal, producing strong intermittency. The duration of the on and off periods are thus governed by “Lévy statistics,” which have been encountered in various fields

[14–22] such as laser cooling of atoms [15], dynamics of disordered [16] and chaotic [18] systems, glassy dynamics [20], or economics and finance [21].

In this Letter, we show that single QD measurements can be used to explicitly compare ensemble- and time-averaged properties and explore some of the unusual phenomena induced by Lévy statistics, such as statistical aging and ergodicity breaking. Using an epifluorescence microscopy setup and a low-noise CCD camera, we simultaneously recorded at room temperature the fluorescence intensity of 215 individual QDs for the duration of 10 min with a time resolution of 100 ms [23]. The blinking of the fluorescence intensity was observed for each QD detected in the field of the camera (Fig. 1). Because of the binary behavior of the blinking process, each intensity time trace was considered simply as a sequence of n on and off times $\{\tau_{\text{on}}^{(1)}, \tau_{\text{off}}^{(1)}, \tau_{\text{on}}^{(2)}, \tau_{\text{off}}^{(2)}, \dots, \tau_{\text{on}}^{(n)}, \tau_{\text{off}}^{(n)}\}$ from which the distributions P_{on} and P_{off} were derived. In our measurements, the on and off periods both followed power-law distributions [25]. After adjustment of the cumulative distributions of the on and off periods for each of the 215 QDs, the exponents μ_{on} and μ_{off} were

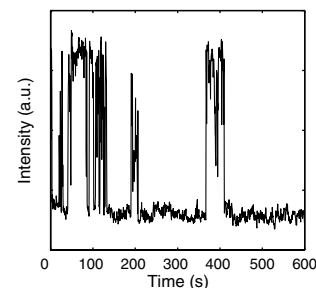


FIG. 1. Fluorescence intermittency of a single CdSe nanocrystal measured over 10 min with 100 ms time bins. Because of the broad distribution of the on and off states, the signal is dominated by a few long events.

estimated to be, respectively, 0.58 (0.17) and 0.48 (0.15), consistent with previous experiments [12,13]. For all pairs of QDs, we also computed the Kolmogorov-Smirnov (KS) likelihood estimator [26] to compare the on (respectively, off) distributions between each pair of QDs. For our set of data, the KS tests yield the same average value of 0.4 (0.3) for both on and off distributions, well above the value 0.05 usually considered as an inferior limit to assume that two data sets have identical distributions. In the following, the 215 QDs are therefore considered as statistically identical, with $\mu_{\text{on}} = 0.58$ and $\mu_{\text{off}} = 0.48$ [27].

The first observation is that, for purely statistical reasons, the fluorescence of QDs is nonstationary, i.e., time translation invariance is broken in the intermittency process. This is best evidenced by studying the rate at which the QDs jump back from the off to the on state (a “switch on” event). For this purpose, we computed the ensemble average of the probability density $s(\theta)$ to observe a QD switching on between θ and $\theta + d\theta$ after a time θ spent in the off state. For off periods following a “narrow” distribution (with a finite mean value $\langle\tau_{\text{off}}\rangle$), $s(\theta)$ —also called the renewal density—would be independent of θ and equal to $1/\langle\tau_{\text{off}}\rangle$. The situation is drastically changed for CdSe QDs due to the fact that $\mu_{\text{off}} < 1$, $\langle\tau_{\text{off}}\rangle$ no longer exists and $s(\theta)$ is then expected to decay as $\theta^{-(1-\mu_{\text{off}})}$ [15]. This means that as time grows the switch on events occur less and less frequently. Figure 2(a) shows that our data match these theoretical predictions: the measured value of $s(\theta)$ decreases as $\theta^{-\alpha}$, with $\alpha = 0.5$ in agreement with the value $(1 - \mu_{\text{off}})$ expected from our measurement of μ_{off} .

This nonstationary behavior can be understood by considering, for each QD, the quantity

$$\theta(N) = \sum_{i=1}^N \tau_{\text{off}}^{(i)}, \quad (1)$$

i.e., the total time spent in the off state during the N first off periods [Fig. 2(b)]. Assuming that the $\tau_{\text{off}}^{(i)}$ are independent and τ_{off} having no mean value, the sum of N such independent random variables must be evaluated by means of the generalized central limit theorem (see, e.g., [15]). This theorem states that $\theta(N)$, instead of scaling as N , grows more rapidly, as $N^{1/\mu_{\text{off}}}$. As shown in Fig. 2(b), the sum $\theta(N)$ is dominated by few events. This central property, distinctive of Lévy statistics, means that, as time grows, one observes long events that are of the order of $\theta(N)$ itself [28]. Hence, the probability for a QD to switch on decreases with time: the system ages [20] and the signal is nonstationary.

To test the assumption that the off events are independent and to gain further insight into this aging effect, we computed the persistence probability $\Pi_0(\theta, \theta + \theta')$, defined as the probability that no switch on event occurs between θ and $\theta + \theta'$. In the case of independent off

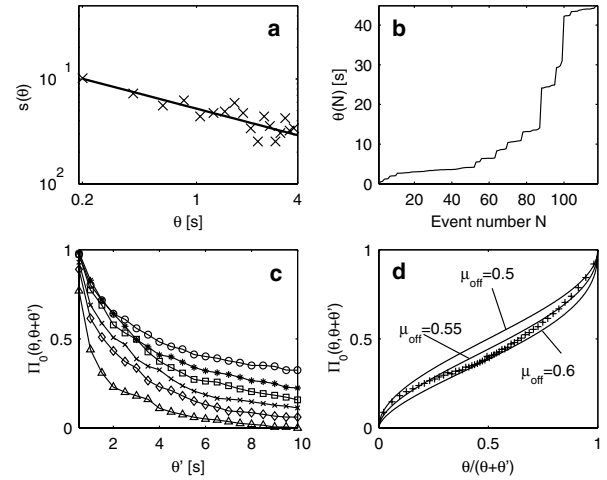


FIG. 2. Statistical aging measured from a sample of 215 QDs. (a) Logarithmic plot of the probability density $s(\theta)$ for a QD to jump in the on state after having spent a total time θ in the off state. The solid line is a power-law adjustment $\theta^{-\alpha}$ with $\alpha = 0.5$. (b) Evolution of the total time spent in the off state $\theta(N)$ with the number N of off periods for a given QD; the sum $\theta(N)$ is dominated by a few events of the order of $\theta(N)$ itself. (c) Persistence probability $\Pi_0(\theta, \theta + \theta')$ measured from the set of 215 QDs for $\theta = 0.1$ s (Δ), $\theta = 0.5$ s (\diamond), $\theta = 1$ s (\times), $\theta = 2$ s (\square), $\theta = 4$ s ($*$), and $\theta = 8$ s (\circ). $\Pi_0(\theta, \theta + \theta')$ depends on θ , indicating that the process is aging. (d) Persistence probability $\Pi_0(\theta, \theta + \theta')$ measured for θ and θ' ranging between 0 and 10 s with 0.1 s time bins and expressed as a function of $\theta/(\theta + \theta')$ (+). Each point corresponds to the average over 200 adjacent data points. The solid lines are the theoretical predictions for exponents $\mu_{\text{off}} = 0.5$, $\mu_{\text{off}} = 0.55$, and $\mu_{\text{off}} = 0.6$.

periods with an exponential distribution (with mean value $\langle\tau_{\text{off}}\rangle$), $\Pi_0(\theta, \theta + \theta')$ is independent of θ , and given by $e^{-\theta'/\langle\tau_{\text{off}}\rangle}$, illustrating that the switching process is stationary. The computation of Π_0 from our data set reveals a completely different pattern: the probability that no switch on event occurs within a given duration θ' decreases with θ [Fig. 2(c)], consistent with the behavior of $s(\theta)$. Furthermore, $\Pi_0(\theta, \theta + \theta')$ is found to depend only on the reduced variable $\theta/(\theta + \theta')$ and to vanish for $\theta/(\theta + \theta')$ close to 0 [Fig. 2(d)]. This result proves that one has to wait a time θ' of the order of θ to have a chance to observe a switch on event, in qualitative agreement with the fact that the largest term of the sum $\theta(N)$ is of the order of $\theta(N)$ itself. Quantitatively, for independent off events distributed according to a Lévy distribution P_{off} with exponent μ_{off} , the persistence probability is expected to read

$$\Pi_0(\theta, \theta + \theta') = \int_0^{\theta/(\theta+\theta')} \beta_{\mu_{\text{off}}, 1-\mu_{\text{off}}}(u) du, \quad (2)$$

where β is the beta distribution on $[0, 1]$ [20,29]. Our data follow this prediction with $\mu_{\text{off}} = 0.55$, in agreement both with our previous estimations of μ_{off} [Fig. 2(d)] and with the assumption that the off events

are independent. These results show that the aging effect has a pure statistical origin and is not related to an irreversible process (such as photodestruction). Because of the statistical properties of Lévy distributions, nonstationarity emerges despite the time independence of the laws governing the microscopic fluorescence process.

From a more general standpoint, this nonstationary behavior also has profound consequences on basic data interpretation, such as the ensemble-averaged total fluorescence emitted by a population of QDs. We illustrated this by studying $\Phi_{\text{on}}(t)$, the fraction of QDs in the on state at a given time t [Fig. 3(a)]. In the context of Lévy statistics, the time evolution of $\Phi_{\text{on}}(t)$ is intimately linked to the relative amount of time spent in the on and off states for each QD. Qualitatively, the off events tend to be dominant whenever $\mu_{\text{off}} < \mu_{\text{on}}$ since $\theta(N) = \sum_{i=1}^N \tau_{\text{off}}^{(i)}$ grows faster than its counterpart $\hat{\theta}(N) = \sum_{i=1}^N \tau_{\text{on}}^{(i)}$. When analyzed in a more quantitative way, the fraction $\Phi_{\text{on}}(t)$ can be shown to decrease asymptotically as $t^{\mu_{\text{off}} - \mu_{\text{on}}}$ [15]. Experimental results confirm this analysis: $\Phi_{\text{on}}(t)$ decays as $t^{-\beta}$, with an exponent $\beta = 0.13$ indeed consistent with the previous determination of μ_{on} and μ_{off} [Fig. 3(a)]. We also observed that the average signal over the whole CCD detector, i.e., the sum of the fluorescence of all the QDs, decays as $t^{-0.18}$, in agreement (within experimental uncertainty) with the fact that time

increasing, less and less QDs are in the on state, causing the total fluorescence to decrease as $\Phi_{\text{on}}(t)$ [Fig. 3(b)]. Importantly, we also observed that this fluorescence decay is laser induced and reversible: after a continuous laser illumination of 10 min, leaving the sample in the dark for about 10–15 min systematically lead to a complete recovery of its initial fluorescence. This confirms that this decay is again purely statistical, and not related to an irreversible bleaching of the QDs.

Our final observation focuses on nonergodic aspects of random processes driven by Lévy statistics. Single particle measurements allow one to compare directly $\Phi_{\text{on}}(t)$ and the fraction of time $\Phi_{\text{on}}^{(i)}(0 \mapsto t)$ spent in the on state between 0 and t for the i th QD. This provides a direct test of the ergodicity of the QD fluorescence. While the ensemble average $\Phi_{\text{on}}(t)$ decays deterministically as $t^{-0.13}$ [Fig. 3(a)], each time average widely fluctuates over time and for a given t , the values of $\Phi_{\text{on}}^{(i)}$ are broadly distributed between 0 and 1, even after a long time of integration [Fig. 3(c)]. To study the behavior of time averages, we calculated the relative dispersion $\sigma_r(t)$ of the time averages at time t , where $\sigma_r(t)$ corresponds to the standard deviation of the distribution of $\Phi_{\text{on}}^{(i)}(0 \mapsto t)$ over the set of QDs, divided by its mean value. Figure 3(d) shows that $\sigma_r(t)$ does not decay to zero, and is still of the order of 1 on the experimental time scale. Therefore, even for long acquisition times, the fluctuations of the time averages from QD to QD remain of the order of the time averages themselves and do not vanish as expected for ergodic systems. These data indicate ergodicity breaking: due to rare events with a duration comparable to the total acquisition time, there is no characteristic time scale over which physical observables can be time averaged. Even for long acquisition time, $\Phi_{\text{on}}^{(i)}(0 \mapsto t)$ does not converge and no information on the ensemble value Φ_{on} can be obtained by time averaging an individual trajectory.

While we found that accurate estimates of μ_{on} and μ_{off} are essential to analyze and predict the statistical properties of the fluorescence, the microscopic origin of these broad distributions is not yet established. Possible explanations are related to the general question of relaxation in disordered systems [14,20,30]. Distributions of off times are sometimes attributed to distributions of static traps from which the charge of an ionized QD escapes by tunneling effect [12,31]. In these models, the value of μ_{off} strongly depends on microscopic characteristics of the QDs, and it is not clear how this is compatible with the statistical homogeneity of the different QDs suggested by the KS test. The dynamic changes of the particle environment are also often invoked to account for the fluctuating emission of the QD [13,32]. Some authors have thus suggested models in which the trap for the charge of the ionized QD follows a random walk in a 1D parameter space, yielding a universal value 1/2 for μ_{off} [13]. However, both of these models (static and dynamic) have yet to be more thoroughly tested.

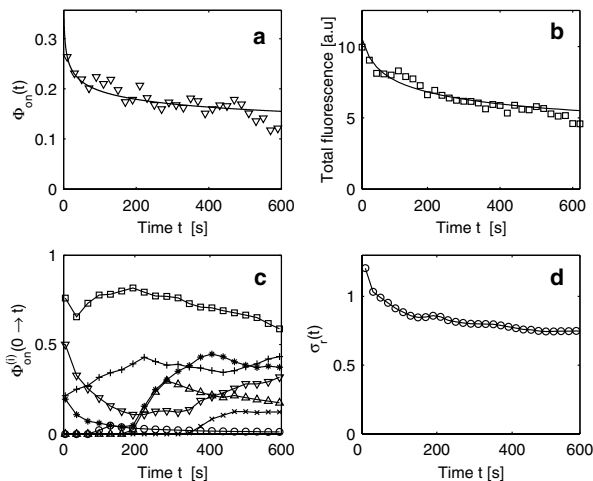


FIG. 3. Nonstationarity and nonergodicity in a sample of QDs. (a) Time evolution of the fraction $\Phi_{\text{on}}(t)$ of QDs in the on state at time t (∇). $\Phi_{\text{on}}(t)$ decays as $t^{-0.13} = t^{\mu_{\text{off}} - \mu_{\text{on}}}$ (solid line). (b) Time evolution of the total fluorescence signal emitted by the sample (\square): the darkening effect follows a $t^{-0.18}$ power-law decay (solid line). (c) Typical time evolution of $\Phi_{\text{on}}^{(i)}(0 \mapsto t)$ —the fraction of time spent in the on state between 0 and t —for seven QDs. The time averages are widely fluctuating, even in the long integration time limit. (d) Evolution of the relative dispersion $\sigma_r(t)$ of $\Phi_{\text{on}}^{(i)}(0 \mapsto t)$ at time t over the ensemble of QDs (\circ). As time grows, $\sigma_r(t)$ tends to a constant value, illustrating that the time averages trajectories do not converge to any asymptotic value.

Since intermittency is an ubiquitous process at the nanometer scale, some of the arguments discussed here for QDs might also apply to other systems. In particular, our analysis shows that nonstationary behavior of the fluorescence—sometimes attributed to photochemical processes—can also have purely statistical origins (such as statistical aging). Recent evidence has shown that this may be the case in a system as microscopically different from QDs as green fluorescent proteins [33]. In this respect, aging and nonergodicity might be an important pattern when studying single nanometer-sized objects in complex environments.

In conclusion, our experimental results show that ensemble-averaged fluorescence properties of individual CdSe QDs are deeply affected by the nonstandard statistical properties of the Lévy statistics governing the blinking process. We found that a population of QDs exhibit statistical aging. Hence, despite the fact that blinking statistics are time independent, the fluorescence emitted by an ensemble of QDs under continuous laser excitation is nonstationary. Our data also evidence that, due to the scaling properties of Lévy statistics, CdSe QDs are nonergodic systems: time- and ensemble-averaged properties do not coincide anymore, in full contrast with usual assumptions when studying nanoscale emitters.

We acknowledge fruitful discussion with F. Amblard, C. Cohen-Tannoudji, C. Godrèche, and J.M. Luck. We thank E. Giacobino for valuable comments on the manuscript.

*Unité de recherche de l'École normale supérieure et de l'Université Pierre et Marie Curie, associée au CNRS.

- [1] F. Reif, *Statistical and Thermal Physics* (McGraw-Hill, New York, 1985).
- [2] A. Papoulis, *Probability, Random Variables and Stochastic Processes* (McGraw-Hill, New York, 1981).
- [3] A. P. Alivisatos, *Science* **271**, 933 (1996); S. Empedocles and M.G. Bawendi, *Acc. Chem. Res.* **32**, 389 (1999).
- [4] M. Bruchez *et al.*, *Science* **281**, 2013 (1998); W. C. W. Chan and S. M. Nie, *Science* **281**, 2016 (1998).
- [5] P. Michler *et al.*, *Nature (London)* **406**, 968 (2000).
- [6] V. I. Klimov *et al.*, *Science* **290**, 314 (2000).
- [7] W. E. Moerner, *Science* **277**, 1059 (1997).
- [8] R. M. Dickson *et al.*, *Nature (London)* **388**, 355 (1997).
- [9] D. A. Vanden Bout *et al.*, *Science* **277**, 1074 (1997).
- [10] K. D. Weston *et al.*, *J. Chem. Phys.* **109**, 7474 (1998).
- [11] M. Nirmal *et al.*, *Nature (London)* **383**, 802 (1996).
- [12] M. Kuno *et al.*, *J. Chem. Phys.* **112**, 3117 (2000); M. Kuno *et al.*, *J. Chem. Phys.* **115**, 1028 (2001).
- [13] K. T. Shimizu *et al.*, *Phys. Rev. B* **63**, 205316 (2001).
- [14] M. Shlesinger, G. M. Zaslavskii, and U. Frisch, *Lévy Flights and Related Topics in pPhysics* (Springer-Verlag, Berlin, 1995).
- [15] F. Bardou, J. P. Bouchaud, A. Aspect, and C. Cohen-Tannoudji, *Lévy Statistics and Laser Cooling* (Cambridge University Press, Cambridge, England, 2001).
- [16] J. P. Bouchaud and A. Georges, *Phys. Rep.* **195**, 127 (1990).
- [17] A. Ott *et al.*, *Phys. Rev. Lett.* **65**, 2201 (1990).
- [18] J. Klafter, M. F. Schlesinger, and G. Zumofen, *Phys. Today* **49**, 33 (1996).
- [19] G. Zaslavsky, *Phys. Today* **53**, 39 (1999).
- [20] J. P. Bouchaud and D. Dean, *J. Phys. I (France)* **5**, 265 (1995).
- [21] B. B. Mandelbrot, *Fractals and Scaling in Finance* (Springer-Verlag, Berlin, 1997).
- [22] V. Da Costa *et al.*, *Eur. Phys. J. B* **13**, 297 (2000)
- [23] We spin coated a nanomolar solution of CdSe/ZnS QDs (1.8 nm core radius, 570 nm peak emission) on a glass coverslip, covered by a thin film of PMMA. The nanoparticles were excited using the 488 nm line of an Ar⁺ laser at an intensity of 0.1 kW/cm². Their fluorescence was recorded using a CCD camera (CoolSnap, Roper Scientific). Using antibunching measurements [5,24] we had previously checked that, for these conditions of sample preparation, the surface concentration of the nanoparticles was low enough so that they could be detected individually.
- [24] G. Messin *et al.*, *Opt. Lett.* **26**, 1891 (2001).
- [25] In agreement with previous measurements [13], we also observed that the on periods display a truncation time τ_{trunc} after which P_{on} would fall more rapidly. However, for our experimental conditions, τ_{trunc} is greater than tens of seconds, fluctuating from QD to QD. On the time scale of our analysis, the occurrence of this truncation does not affect our results.
- [26] See, e.g., *Numerical Recipes* (Cambridge University Press, Cambridge, England, 1993), 2nd ed.
- [27] All the results shown in this Letter are found unchanged when working with a subset of QDs for which the average values of the KS test are as high as 0.62 (0.3) for P_{on} and 0.63 (0.30) for P_{off} , confirming the statistical homogeneity of the sample.
- [28] This result is in striking contrast with the case of narrow distributions. For an exponential distribution ae^{-at} , the largest event is only of the order of $\log(N)/a$.
- [29] C. Godrèche and J. M. Luck, *J. Stat. Phys.* **104**, 489 (2001).
- [30] E. Montroll and J. T. Bendler, *J. Stat. Phys.* **34**, 129 (1984).
- [31] R. Verberk, A. M. von Oijen, and M. Orrit (to be published).
- [32] Y. Jung, E. Barkai, and R. J. Silbey, *Adv. Chem. Phys.* **123**, 199 (2002).
- [33] F. Amblard (private communication).

Colloidal CdSe/ZnS quantum dots as single-photon sources

X Brokmann¹, G Messin¹, P Desbiolles¹, E Giacobino¹,
M Dahan¹ and J P Hermier^{1,2}

¹ Laboratoire Kastler Brossel, École normale supérieure, Université Pierre et Marie Curie et CNRS, 24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France

² Fédération de Recherche Matériaux et Phénomènes Quantiques, Université Denis Diderot, 2 place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France

E-mail: hermier@lkb.ens.fr

New Journal of Physics **6** (2004) 99

Received 29 March 2004

Published 29 July 2004

Online at <http://www.njp.org/>

doi:10.1088/1367-2630/6/1/099

Abstract. The fluorescence of colloidal CdSe/ZnS nanocrystals at room temperature exhibits a perfect antibunching under continuous or pulsed excitation. In this paper, we discuss the consequences of fluorescence properties of CdSe nanocrystals on the generation of single photons. In particular, we examine the role of Auger processes in the inhibition of multiexcitonic emission. We also discuss the relationship between Auger processes and the fluorescence intermittency of CdSe quantum dots. Altogether, features discussed here indicate that CdSe/ZnS nanocrystals are promising single-photon sources.

Contents

1. Introduction	2
2. Experimental setup	2
3. Results	3
3.1. Fluorescence antibunching	3
3.2. Effects of Auger processes over single-photon emission	4
3.3. Fluorescence intermittency	6
4. Conclusion	7
Acknowledgments	7
References	7

1. Introduction

Single-photon emission has been demonstrated using the fluorescence of single emitters such as atoms [1], ions [2], organic molecules [3], semiconductor quantum dots [4]–[6] and nitrogen vacancy centres [7]. In the field of quantum information processing, single-photon sources could be used for quantum cryptography or optical quantum computation [8, 9].

Colloidal CdSe/ZnS core-shell nanocrystals have also been the focus of great attention because of their high quantum yield and high photostability at room temperature. These features make them promising emitters not only for quantum information but also for biological labelling [10] or the realization of devices such as thin-film LEDs or nanocrystal quantum dot (QD) lasers [11]–[13]. When observed individually, CdSe QDs exhibit remarkable properties. The fluorescence is known to exhibit fluorescence lifetime fluctuations [14], spectral shifts [15] and fluorescence intermittency resulting in the alternance of dark and bright periods [16]. Compared with atoms or molecules, CdSe/ZnS QDs provide opportunities to investigate new phenomena as well. The nanometre size of these QDs (radius <5 nm) permits the investigation of interactions between efficient multi-carriers known as Auger processes. Their effect on the fluorescence properties of CdSe QDs have previously been examined in detail for optical gain generation and lasing from CdSe QDs [11]–[13].

In this paper, we investigate the generation of single photons by colloidal CdSe/ZnS QDs under continuous (cw) and pulsed excitation, the latter being the regime used in quantum information protocols. First, we show that perfect antibunching can be obtained. Next, the nature of Auger processes and their role in single-photon emission are discussed. We show that the efficiency of these processes in nanometre-sized CdSe QDs is a clear advantage for triggered single-photon generation since it makes the light emission properties of CdSe nanocrystals similar to those of individual quantum systems such as single atoms or molecules. Finally, we discuss the implications of recent results concerning the fluorescence intermittency of colloidal CdSe QDs.

2. Experimental setup

In our experiments, colloidal CdSe/ZnS core/shell nanocrystals are chemically synthesized semiconductor nanoparticles with a mean radius of 1.7 nm and a peak wavelength emission about 560 nm. To collect the fluorescence of a single nanocrystal, samples are prepared by spin coating a nanomolar solution of quantum dots in butanol on a cleaned glass coverslip. After deposition, the mean distance between two nanocrystals is about 1 μ m. The fluorescence emitted by a single nanocrystal under continuous or pulsed excitation is collected by a confocal microscope. For continuous wave excitation we used the 514 nm line of an Ar-ion laser. The pulsed excitation comes from a 400 nm pulsed laser diode whose pulse duration ($\tau_p = 50$ ps) is much shorter than the fluorescence lifetime $\tau_{rad} = 20$ ns of our CdSe QDs to suppress two-photon emission as far as possible. The energy per pulse could be continuously set from 0 to 5 pJ, and the pulse repetition period was set at 100 ns, a duration much longer than τ_{rad} to avoid the overlap of triggered photons generated by consecutive pulses. The fluorescence photons are collected by a high numerical aperture (NA) oil immersion objective (Olympus $\times 100$, apochromatic, NA = 1.4), which also focuses the excitation beam to the diffraction limit (waist ~ 250 nm). Photons are then sent to a standard high sensitivity Hanbury-Brown and Twiss setup. It consists of a 50/50 non-polarizing

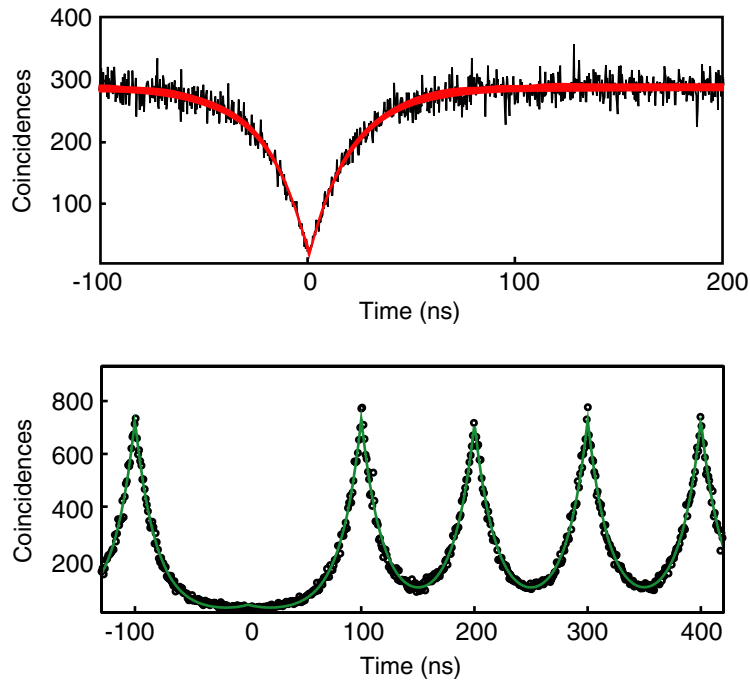


Figure 1. Histogram of coincidence counts of single QDs' fluorescence (\circ) after background correction under continuous (a) or pulsed (b) excitation. (a) The red solid line is a fit yielding a 20 ns excited-state lifetime for this nanocrystal. (b) The blue solid line is a fit of the data, yielding a 22 ns excited-state lifetime for this nanocrystal.

beamsplitter and two (start/stop) photon avalanche photodiodes (APDs) with a time resolution of 300 ps. A picosecond time analyser (PTA, EG&G 91 38) provides the histogram of time delays between photons. We also introduced a delay of 200 ns in the stop channel to record the signal at negative correlation times.

3. Results

3.1. Fluorescence antibunching

First we analyse the autocorrelation function of the emitted light under pulsed or continuous excitation. Under cw excitation, our data are in agreement with [17]. The histogram of coincidence counts at short time scale given by the PTA exhibits a dip centred at zero delay (figure 1(a)). After correction for the background noise due to photodiodes, the antibunching amplitude is found to be greater than 99%. The adjustment of our experimental data lead to a value of $\tau_{rad} = 20$ ns. Under pulsed excitation, the autocorrelation function also shows few coincidence counts at zero delay (figure 1(b)). For all accessible pumping power, the value of the zero delay peak area is less than 0.05, systematically dropping close to zero after subtracting the background due to the APD dark counts. As for cw excitation, the value of τ_{rad} deduced from our experimental data is of the order of 22 ns.

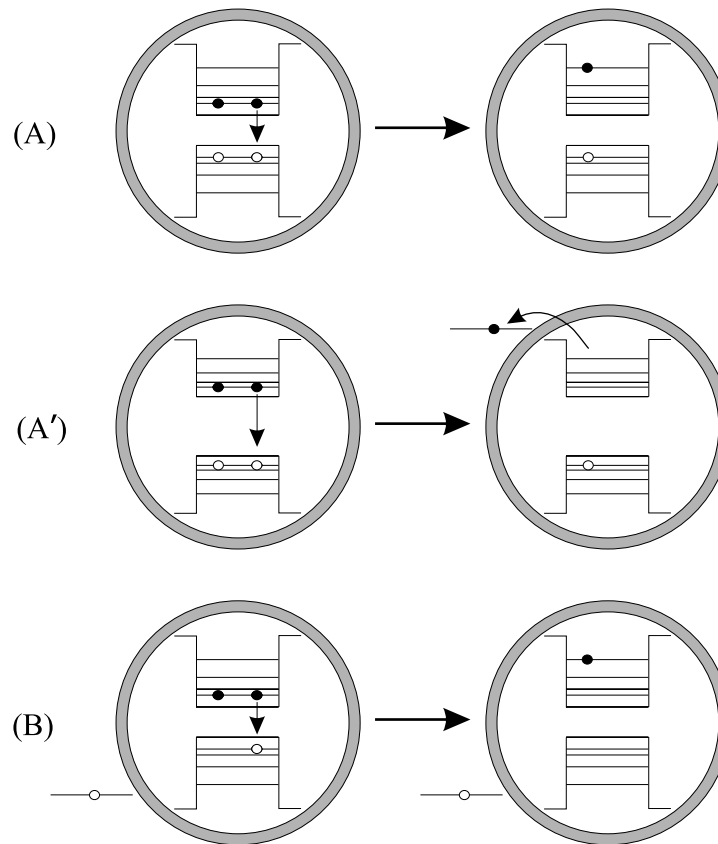


Figure 2. Scheme presenting Auger effects considered in this paper. In each process, one electron/hole pair does not decay radiatively. The energy recombination is transferred to the remaining carrier. (A) Auger relaxation of a biexciton in a neutral QD. The remaining excited carrier is still confined in the nanocrystal. (A') Autoionization of a neutral QD by Auger process. The remaining excited carrier is ejected from the QD. (B) Auger relaxation of a bi-exciton in an ionized QD leading to the QD extinction.

3.2. Effects of Auger processes over single-photon emission

The absence of photon coincidences at zero delay under pulsed and continuous excitation proves that colloidal CdSe QDs are perfect single-photon emitters at room temperature. The antibunching exhibited by the fluorescence of these solid-state sources is similar to that of a single quantum system such as an atom. QDs are often called artificial atoms since the three-dimensional confinement results in a discrete, atomic-like energy spectrum. Perfect antibunching strengthens this analogy. However, QDs exhibit an important difference with atoms or molecules. Multi-electron/hole pairs can be created by the excitation laser. The crucial point is that multi-excitonic states recombine non-radiatively due to the Auger effect as shown schematically in figure 2 (type A Auger effect). In this process, a ground-state bi-exciton decays to an excited monoexcitonic state without any photon emission. Subsequently, the excited carrier rapidly relaxes to its ground state in a couple of ps [19]. Recent experimental and theoretical results showed that, for CdSe QDs with radii ranging between 1.2 and 3.6 nm, the Auger process occurs in less

than 100 ps [18, 19], much faster than $\tau_{rad} \sim 20$ ns. Auger recombination is thus the dominating relaxation process for multiexcitonic states.

Auger processes are much more efficient in nanometre-sized structures than in bulk materials for two reasons. First, for the bulk case, the maximum density of excitons corresponds to one exciton per excitonic volume $V \sim a_B^3$, where a_B is the Bohr radius of the exciton. Above this density, carriers do not form an exciton gas but a metallic plasma and strong screening effects reduce Coulomb interactions. In nanocrystals with a radius lower than a_B , several excitons can occupy a volume smaller than V , without the possibility of dynamic screening because of strong carrier confinement. The overlap between carrier functions is increased and Coulomb interactions are enhanced. Second, there is no wave vector carrier momentum conservation in QDs because of their nanometre size. Due to this non-conservation, which may be interpreted in terms of translation-symmetry breaking, Auger transitions which exhibit a low probability in bulk material are very efficient in QDs. Accurate calculations of Auger rates [19] confirm this picture.

The influence of the efficiency of Auger processes on colloidal CdSe QD fluorescence antibunching has already been invoked [17] for continuous excitation to explain the multiexcitonic emission suppression. Under pulsed excitation, the absence of the zero delay peak confirms that if the QD contains more than a single electron/hole pair after a pulse excitation, non-radiative recombination via process A is the preferential energy relaxation channel until a single electron/hole remains. Only the last pair can recombine radiatively and no more than one photon can be emitted after one pulse excitation.

The absence of multiexcitonic emission for high pumping power is specific to colloidal CdSe QDs. For epitaxially grown QDs, the suppression of radiative bi-exciton recombination requires low pumping. Close to saturation of the monoexcitonic emission, which is the regime called for efficient single-photon generation, radiative recombination of bi-excitons is always observed [6, 20]. As a result, epitaxially grown QDs require the use of spectral filtering which isolates the first exciton emission of a single QD from the bi-excitonic emission but also introduces optical losses. In terms of photon collection efficiency, a crucial parameter for the realization of a practical single-photon source [8], monoexcitonic emission thus provides a specific advantage to CdSe QDs. This benefit is reinforced by the high quantum yield of CdSe QDs at room temperature. Working at room temperature allows the use of high-NA immersion objective, leading to simple and efficient light collection. A detailed analysis [21] of the collection efficiency of our setup showed that 12.5% of the emitted photons were collected and detected, and that the probability to detect a photon per pulse was equal to 3%, much higher than the rate of 0.1% obtained for epitaxially grown QDs [22].

In addition to antibunching observed under continuous or pulsed excitation, light emission by single electron/hole pair recombination successfully explains the fluorescence saturation of a single emitter. Under continuous excitation, measurements on the fluorescence saturation were consistent with a two-level system [17]. Under pulsed excitation, we investigated the probability σ to excite the emitting transition versus the pump pulse power, knowing that this probability is crucial for the efficient generation of triggered single photons. To deliver a single photon per pump pulse, the probability σ to excite the emitter must be close to 1. Our results [21] showed that the variation of the photon emission intensity versus the excitation intensity can be fitted by an effective two-level model and an excitation probability greater than 0.95 can be obtained.

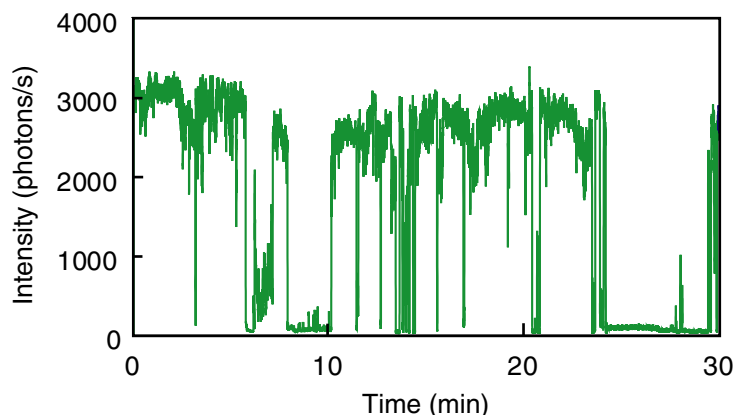


Figure 3. Time trace of a single QD fluorescence registered over 30 min with 100 ms time bins. ‘On’ and ‘off’ events with duration of the order of the acquisition time are likely to be observed due to power-law distributions.

3.3. Fluorescence intermittency

Due to Auger process *A*, colloidal CdSe QDs are similar to a two-level system in terms of single-photon generation and fluorescence saturation. However, the overall fluorescence properties of colloidal CdSe QDs are not identical to a simple two-level system. Resonant excitation is not required since efficient excitation has been observed for many wavelengths. CdSe QD fluorescence is also known to exhibit intermittency resulting in the alternance of dark and bright periods (figure 3) [16]. A statistical analysis of the intermittency reveals power-law distributions of the ‘on’ and ‘off’ times [23]–[25]. Consequences of these statistics have been analysed. Statistical aging and ergodicity breaking have been reported [26, 27]. In the field of quantum cryptography, the main problem is the random duration of bright and dark periods. ‘On’ and ‘off’ times have no mean value and very long ‘off’ events are observed (figure 3). These long dark periods are the main restriction for the use of colloidal CdSe QDs as single-photon emitters.

The origin of fluorescence intermittency has been studied in detail [24, 25, 28]. It is now commonly admitted that blinking arises from rare ionization events that eject a carrier from the QD [24, 25]. For simplicity, we will consider in the following that the hole is the ejected carrier. The ionized QD is non-fluorescent due to a multiparticle process between subsequent exciton and the remaining electron as shown schematically in figure 2 (type *B* Auger effect). An Auger ionization model was proposed earlier by Efros *et al* [28] to explain the QD fluorescence intermittency. The relaxation of a bi-excitation following the Auger process presented in figure 2 (type *A'* Auger effect) was assumed to lead to ionization of the QD, which consequently became non-fluorescent. According to this model, single-photon emission and fluorescence intermittency would then be intimately linked, as suggested in [17]. However, recent results showed that process *A'* is probably not involved in the QD ionization [24, 25]. Ionization process *A'* would lead to a mono-exponential probability distribution of ‘on’ events [28], which is not consistent with the power-law distributions and the large dynamic range of time scale observed experimentally (from 100 μ s to 100 s). Actually, electron or hole tunnelling to a fluctuating environment of trap sites is more probably at the origin of blinking [24, 25].

Although fluorescence intermittency has long been considered as an intrinsic property of CdSe QDs, very recent results [29] demonstrated that the intermittency of single QDs could be

significantly reduced by chemical processes. Surrounding the QDs with a concentrated solution of molecules containing thiol groups (such as betamercaptoethanol or DTT) suppresses the blinking. This suppression is presumably due to the passivation of surface traps by thiol groups, which also confirms that Auger process A' is not the cause of QD ionization.

4. Conclusion

In conclusion, we have analysed the generation of single photons by colloidal CdSe QDs. At room temperature, due to the efficiency of Auger processes, the fluorescence of colloidal CdSe QDs exhibits a perfect antibunching under continuous or pulsed excitation. The collection of single photons is also both simple and efficient. The main drawback of colloidal CdSe/ZnS is their fluorescence intermittency although recent results showed that it could be partly suppressed. Auger processes also take part in the blinking mechanism but are probably not at the origin of the effect. Overall, CdSe/ZnS QDs appear as promising single-photon sources.

Acknowledgments

This work has been supported by the 'S4P' project from the European Union IST/FET/QIPC program, by the French project ACI Cryptologie from Ministre de la Recherche and by the French project Sesame Ouno from the Region Ile de France.

References

- [1] Kimble K J, Dagenais M and Mandel L 1977 *Phys. Rev. Lett.* **39** 691
- [2] Diedrich F and Walther H 1987 *Phys. Rev. Lett.* **58** 203
- [3] Lounis B and Moerner W E 2000 *Nature* **407** 491
- [4] Michler P, Imamoglu A, Mason M D, Carson P J, Strouse G F and Buratto S K 2000 *Nature* **406** 968
- [5] Santori C, Pelton M, Solomon G, Dale Y and Yamamoto Y 2001 *Phys. Rev. Lett.* **86** 1502
- [6] Sebald K, Michler P, Passow T, Hommel D, Bacher G and Forchel A 2002 *Appl. Phys. Lett.* **81** 2920
- [7] Kurtsiefer C, Mayer S, Zarda P and Weinfurter H 2000 *Phys. Rev. Lett.* **85** 290
- [8] Gisin N, Ribordy G, Tittel W and Zbinden H 2002 *Rev. Mod. Phys.* **74** 145
- [9] Knill E, Laflamme R and Milburn G 2001 *Nature* **409** 46
- [10] Alivisatos A P 2004 *Nature Biotech.* **22** 47
- [11] Klimov V I, Mikhailovsky A A, McBranch D W, Leatherdale C A and Bawendi M G 2000 *Science* **287** 1011
- [12] Klimov V I, Mikhailovsky A A, Xu S, Malko A, Hollingsworth J A, Leatherdale C A, Eisler H J and Bawendi M G 2000 *Science* **90** 314
- [13] Mikhailovsky A A, Malko A V, Hollingsworth J A, Bawendi M G and Klimov V I 2002 *Appl. Phys. Lett.* **80** 2380
- [14] Schelgel G, Bohnenberger J, Potapova I and Mews A 2002 *Phys. Rev. Lett.* **88** 137401
- [15] Empedocles S A, Norris D J and Bawendi M G 1996 *Phys. Rev. Lett.* **77** 3873
- [16] Nirmal M, Dabbousi B, Bawendi M G, Macklin J J, Trautman J K, Harris T D and Brus L E 1996 *Nature* **383** 802
- [17] Lounis B, Bechtel H A, Gerion D, Alivisatos P and Moerner W E 2000 *Chem. Phys. Lett.* **329** 399
- [18] Achermann M, Hollingsworth J A and Klimov V I 2003 *Phys. Rev. B* **68** 245302
- [19] Wang L W, Califano M, Zunger A and Franceschetti A 2003 *Phys. Rev. Lett.* **91** 056404
- [20] Aichele T, Zwiller V, Benson O, Akimov I and Henneberger F 2003 *J. Opt. Soc. B* **20** 2189
- [21] Brokmann X, Giacobino E, Dahan M and Hermier J P 2004 submitted for publication

- [22] Moreau E, Robert I, Grard J M, Abram I, Manin L and Thierry-Mieg V 2001 *Appl. Phys. Lett.* **79** 2865
- [23] Shimizu K T, Neuhauser R G, Leatherdale C A, Empedocles S A, Woo W K and Bawendi M G 2001 *Phys. Rev. B* **63** 205316
- [24] Kuno M, Fromm D P, Hamann H F, Gallagher A and Nesbitt D J 2001 *J. Chem. Phys.* **115** 1028
- [25] Kuno M, Fromm D P, Johnson S T, Gallagher A and Nesbitt D J 2003 *Phys. Rev. B* **67** 125304
- [26] Messin G, Hermier J P, Giacobino E, Desbiolles P and Dahan M 2001 *Opt. Lett.* **26** 1891
- [27] Brokmann X, Hermier J P, Messin G, Desbiolles P, Bouchaud J P and Dahan M 2003 *Phys. Rev. Lett.* **90** 120601
- [28] Efros A L and Rosen M 1997 *Phys. Rev. Lett.* **78** 1110
- [29] Hohng S and Ha T 2004 *J. Am. Chem. Soc.* **126** 1324

3 Accrochage et détection de l'ADN sur une surface

3.1 Présentation, contexte

Le cadre général des travaux présentés dans la suite de ce mémoire est l'étude à l'échelle de la molécule individuelle des interactions ADN/protéines. Ce domaine doit son expansion récente au développement des techniques de micromanipulation de molécules individuelles d'ADN. Les physiciens à l'origine de ces méthodes qui permettent d'isoler et d'étirer l'ADN ont dans un premier temps consacré leurs efforts à l'étude des propriétés mécaniques de ce polymère naturel [61, 62, 63, 64, 65]. Ils se sont ensuite penchés sur ses interactions avec des protéines. Dans la plupart des expériences impliquant des protéines, c'est leur action sur l'ADN qui est mise en évidence sans que la position des protéines elles-mêmes ne soit déterminée. En mesurant des modifications de longueur ou torsion de l'ADN induites par des topoisomérases ou des polymérases par exemple, il est possible de caractériser la dynamique d'interaction de protéines individuelles avec l'acide nucléique [66, 67, 68, 69]. Les protocoles mis en place sont donc particulièrement bien adaptés à l'étude d'enzymes qui exercent des forces sur l'ADN. Nous allons voir que ces techniques, en revanche, sont plus difficilement utilisables lorsqu'il s'agit de visualiser directement le mouvement d'une enzyme en interaction avec l'ADN, en utilisant par exemple la microscopie de fluorescence pour déterminer la trajectoire d'une protéine couplée à un fluorophore.

La visualisation d'une protéine fluorescente en interaction avec de l'ADN requiert en effet de concilier deux exigences en apparence peu compatibles : la concentration de protéines en solution doit être suffisamment élevée pour observer des interactions avec l'ADN à une fréquence relativement élevée, et la fluorescence issue de la protéine en interaction avec l'ADN ne doit pas être masquée par celle des protéines diffusant en solution. La microscopie de fluorescence par onde évanescente (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy - TIRFM) apporte une solution élégante à ce problème [70]. En excitant sélectivement les fluorophores au voisinage d'une surface, cette technique permet d'augmenter considérablement le rapport signal/bruit pour une molécule donnée, en diminuant la fluorescence de provenant des autres fluorophores en solution, dont la concentration peut rester compatible avec les exigences expérimentales. Bien sur, l'ADN doit également être positionné et étiré au voisinage de la surface, à une distance de l'ordre d'une centaine de nanomètres, pour que la technique soit efficace. Cette dernière exigence rend la plupart des techniques de micromanipulation, rapidement décrites dans la suite de l'exposé, difficilement utilisables en TIRFM.

Techniques de micromanipulation de l'ADN

Une des grandes classes d'expériences destinées à manipuler l'ADN utilise des billes couplées à -au moins- une extrémité de la molécule. Une première méthode consiste à attacher une extrémité de l'ADN à une surface et à coupler l'autre extrémité à une bille de taille micrométrique, susceptible d'être détectée par microscopie conventionnelle. L'action d'enzymes modifiant la longueur de l'ADN peut ainsi être caractérisée en analysant l'évolution temporelle de la position de la bille [71, 72, 73]. L'ADN peut également être couplée à une bille magnétique, dont la position est contrôlée à l'aide d'une "pince magnétique" [74]. Cette approche permet non seulement de modifier ou de mesurer la longueur de l'ADN mais également d'en déterminer la torsion, ce qui a permis par exemple de nombreuses études sur les topoisomérases [68, 69]. Pour des raisons techniques, l'ADN est perpendiculaire à la surface à laquelle il est accroché dans ces configurations. L'utilisation éventuelle de la microscopie par onde évanescente est donc restreinte à des

sites de l'ADN très proche de la surface. A notre connaissance, aucun travail n'a été publié en microscopie de fluorescence dans ces configurations pour étudier des interactions entre ADN et protéines.

Une extrémité de l'ADN peut également être couplée à une bille diélectrique, de taille micrométrique, piégée au foyer un faisceau laser. Cette "pince optique" [61] permet de déterminer avec une grande précision la force qu'exerce sur l'ADN une enzyme (par exemple fixée à une surface) et qui agit sur l'autre extrémité de l'ADN [75]. L'ADN peut également être étiré à l'aide de deux pinces optiques, et servir par exemple à l'étude d'une polymérase [76] ou d'une enzyme de restriction [77]. En appliquant un flux hydrodynamique à une molécule d'ADN tenue par une pince, celle-ci est étirée et peut servir de substrat à des protéines. Dans la plupart des expériences menées dans cette configuration, la protéine étudiée n'était pas fluorescente. L'ADN en revanche était teinté à l'aide d'une molécule fluorescente, que ce soit un intercalant (YOYO1 par exemple) ou un ligand du sillon de l'ADN (SyBr). L'assemblage de la chromatine [78], la digestion par une exonucléase [79] ou par une endonucléase [80], la dénaturation par une hélicase [81] ont été ainsi récemment étudiées. L'étude en microscopie de fluorescence en présence de pinces optiques n'est pas simple. Les billes diélectriques diffusent la lumière IR utilisée pour les piéger, diminuant le rapport signal/bruit de détection en épifluorescence. Leur taille micrométrique ne rend possible l'utilisation d'une imagerie en onde évanescente qu'au prix d'un dispositif expérimental complexe, dans lequel la surface de verre utilisée est structurée [76].

Une autre approche consiste à ne pas utiliser de billes, magnétiques ou diélectriques, et à attacher directement une des extrémités de l'ADN à une surface. L'ADN est alors étiré à l'aide d'un champ électrique [82, 83] ou d'un écoulement [84, 85, 86]. La préparation de surfaces permettant l'utilisation de techniques électrophorétiques est longue et délicate, ce qui représente un inconvénient majeur. En effet, de nombreux tests sont nécessaires à la conduite de ces expériences, par exemple pour déterminer les concentrations optimales en protéines ou réduire les interactions non-spécifiques des protéines avec la surface. Il est donc indispensable de pouvoir bénéficier facilement et rapidement d'un nombre important de surfaces. De plus, les champs électriques élevés utilisés (supérieurs à 10^6 V/m dans [82]) peuvent perturber les solutions.

Le peignage moléculaire constitue une autre technique permettant de déplier les molécules d'ADN, [88, 89]. Cette technique permet d'étirer parallèlement un grand nombre de molécules d'ADN sur une surface. Le peignage est une technique simple à mettre en œuvre puisqu'il ne requiert que l'utilisation de surfaces hydrophobes et ne nécessite aucune modification chimique des molécules d'ADN. En plaçant l'ADN à pH acide (pH=5,5), l'extrémité des molécules se dénature et peut s'ancrer à une surface hydrophobe. Un ménisque air-eau en mouvement déplie alors l'ADN, et "colle" la molécule à la surface. Les molécules ainsi peignée peuvent servir de substrat à des protéines. Deux études ont ainsi permis de mettre en évidence l'incorporation de nucléotides fluorescents par une polymérase à ADN [90] et à ARN [91]. Néanmoins, le surétirement des molécules d'ADN et leurs nombreux points d'ancrage à la surface limitent l'utilisation du peignage pour l'étude des interactions ADN-protéines.

Nous avons développé une nouvelle technique, baptisée "étirement", qui repose sur un principe voisin du peignage sans en présenter ses inconvénients. Cette technique permet d'obtenir des molécules d'ADN étirées, spécifiquement attachées par leurs extrémités à une surface. La majeure partie d'une molécule individuelle est libre, et située à une distance de l'ordre d'une centaine de nanomètres de la surface. De plus, les molécules ne sont pas surétirées, leur taux d'étirement est de l'ordre de 70 pour cent. L'ensemble forme un substrat favorable à l'étude des interactions ADN/protéines par microscopie par onde évanescente, sous réserve que soient maî-

trisées les interactions non-spécifiques de l'ADN et des protéines avec la surface, problème que nous aborderons plus tard. Nous allons maintenant décrire brièvement le dispositif expérimental utilisé étirer l'ADN au voisinage d'une surface, puis nous analyserons les fluctuations transverses des molécules ainsi étirées.

3.2 Etirement de molécules d'ADN individuelles au voisinage d'une surface

Méthode d'étirement

Dans ces expériences, nous avons utilisé l'ADN du bactériophage λ , un ADN commercial de 48502 paires de bases. Ces molécules ont été rendues fluorescentes par couplage avec le YOYO-1. Nous avons utilisé des techniques d'épifluorescence standard, sur un microscope inversé.

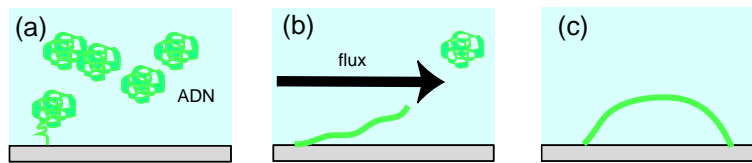


FIG. 9 – *Principe de l'étirement.* (a) Les molécules d'ADN en solution peuvent s'accrocher à la surface; (b) un flux hydrodynamique les déplie partiellement, (c) si la deuxième extrémité s'accroche, la molécule d'ADN est étirée.

La technique d'étirement que nous avons développée s'inspire du peignage tout en se déroulant intégralement en solution, à l'intérieur d'une cavité à écoulement. L'utilisation d'une lame hydrophobe (lamelle de microscope recouverte de polystyrène par "spin-coating" d'une solution à 5 pour cent du polymère dans le toluène) et d'un pH soigneusement ajusté ($\text{pH} = 5,5$) permettent l'ancrage par leurs extrémités des molécules d'ADN à la surface. Les molécules sont ensuite dépliées à l'aide d'un flux hydrodynamique; au cours de cette phase, une partie des molécules accrochées à la surface s'accrochent par leur seconde extrémité, formant ainsi des arches qui persistent après la suppression du flux (figure 9).

Cette technique permet, tout comme le peignage, d'étirer parallèlement de nombreuses molécules d'ADN. Les forces exercées sur l'ADN par l'application d'un flux hydrodynamique sont beaucoup plus faibles (en général inférieures à 1 pN) que celles produites dans le cas du peignage par le passage d'un ménisque air-eau, l'ADN n'est donc pas surétiré. L'ajustement du flux appliqué durant la phase d'étirement des molécules permet de choisir le taux d'étirement des molécules étirées. De plus, cette technique évite la formation de points d'ancrage multiples à la surface le long des molécules d'ADN. La plus grande partie de chaque molécule étirée est donc libre et en moyenne éloignée de la surface d'une distance qui est de l'ordre d'une centaine de nanomètres. Cette technique permet d'étirer des molécules d'ADN même si celles-ci ne sont pas entières, ce qui est à la fois un avantage car cela conduit à une densité élevée de molécules sur la surface et un inconvénient car la longueur des molécules étirées peut différer d'une molécule à l'autre. Le photoblanchiment des fluorophores utilisés pour marquer l'ADN (YOYO-1, SYBR Gold) peut conduire à la photodestruction des molécules d'ADN. Dans le cas de l'ADN étiré, le photoblanchiment a un effet conduit à la cassure du double brin d'ADN (figure 10). Nous avons réduit le photoblanchiment en ajoutant à la solution un agent réducteur (DTT, dithiothreitol) et un mélange d'enzymes (glucose oxydase et catalase) éliminant l'oxygène présent en solution.

Nous avons pu ainsi observer des molécules d'ADN étirées pendant plusieurs minutes.

Résultats

Les films réalisés montrent que seules les extrémités de l'ADN sont accrochées à la surface. En effet, lorsque qu'une molécule casse sous l'effet du photoblanchiment, l'ADN se rétracte, et seules restent visibles les points d'ancrage (figure 10). Après étirement, un rinçage de la cavité à écoulement avec une solution de pH quelconque n'affecte pas les molécules étirées. Comme le montre la figure 10(A), il est possible d'obtenir des densités importantes de molécules étirées. Cette densité peut être contrôlée expérimentalement en ajustant la concentration d'ADN utilisée et sa durée d'interaction avec la surface avant étirement.

Si les fluctuations longitudinales des molécules étirées ne sont pas accessibles expérimentalement, les fluctuations transverses le sont (figure 10(B)), et nous en ferons l'analyse dans la partie suivante. Enfin, si les meilleurs résultats ont été obtenus sur des surfaces couvertes de polystyrène, il est possible d'étirer les molécules d'ADN sur d'autres surfaces hydrophobes telles que le PMMA.

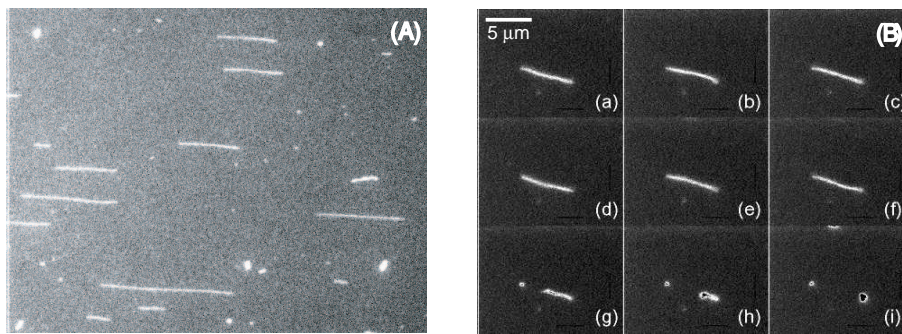


FIG. 10 – Molécule d'ADN étirée : (A) zone large. (B) extraits d'un film (5 s entre deux images) : la molécule d'ADN fluctue sous l'effet des fluctuations thermiques puis casse sous l'effet du photoblanchiment. Après la cassure, les deux fragments se rétractent vers les extrémités de la molécule, ce qui démontre qu'elle n'était ancrée à la surface que par les extrémités.

Analyse des fluctuations transverses d'une molécule d'ADN étirée

Outre son intérêt intrinsèque, la compréhension de la dynamique des molécules d'ADN étirées est indispensable en vue des expériences ultérieures d'interaction avec les protéines. En effet, le mouvement, expérimentalement accessible, d'enzymes agissant sur des molécules étirées est une combinaison du mouvement des enzymes le long des molécules d'ADN et des fluctuations des molécules d'ADN étirées. La séparation de ces deux contributions ne peut être effectuée que si ont été au préalable caractérisées les fluctuations des molécules d'ADN étirées.

Grâce à des expériences d'étirement de molécules individuelles d'ADN, l'élasticité de l'ADN a pu être mesurée et décrite [92, 93, 62] avec une excellente précision. On introduit pour cela la notion de longueur de persistance L_p , distance caractéristique sur laquelle est conservée l'orientation de l'ADN, qui vaut 50 nm environ (soit 150 paires de bases). Le modèle le plus à même de rendre compte des courbes d'élasticité expérimentales de l'ADN est appelé "modèle du ver" [74].

Grâce à ce modèle, il est possible de déterminer une formule d'interpolation, valable pour un fragment d'ADN de longueur $L \gg L_p$ donnant l'extension x de la molécule d'ADN en fonction de la force F exercée, avec une précision arbitrairement grande [94, 62]. Bouchiat et al. se sont arrêtés à l'ordre 7, où l'écart entre la formule d'interpolation et la valeur exacte est inférieur à 0.01 % [62]. Cette formule peut être écrite sous la forme $F = k x f(x/L)$ afin d'introduire la fonction f , qui ne dépend que du taux d'étirement x/L des molécules et qui traduit la non-linéarité de l'élasticité de l'ADN ($\lim_{x \rightarrow 0} f(x) = 1$) :

$$F = k x f\left(\frac{x}{L}\right) \quad \text{avec} \quad k = \frac{3 k_B T}{L L_p}, \quad f\left(\frac{x}{L}\right) = \frac{2}{3} + \frac{L}{6x} \left(\frac{1}{(1-x/L)^2} - 1 \right) + \frac{2}{3} \sum_{i=2}^7 a_i \left(\frac{x}{L}\right)^{i-1}, \quad (2)$$

et $a_2 = -0.5164228$, $a_3 = -2.737418$, $a_4 = 16.07497$, $a_5 = -38.87607$, $a_6 = 39.49944$, $a_7 = -14.17718$.

Pour analyser nos expériences, nous avons décomposé les molécules d'ADN en un ensemble de billes et de ressorts, une modélisation très classique en physique des polymères [85, 95, 96, 97]. Les molécules d'ADN (de longueur totale L) sont divisées en N sous-molécules de longueur de contour L_0 chacune connectées entre elles par des "billes" mobiles au cours du temps. Le mouvement de chaque bille a été décrit par une équation de Langevin. Deux billes successives sont couplées par la force (2). L'interaction d'une bille avec le solvant est décrite par un mouvement Brownien. Le système d'équations obtenu possède des solutions analytiques si les ressorts sont linéaires. Bien que l'élasticité de l'ADN, décrite par le "modèle du ver", soit non-linéaire, il est possible d'appliquer un modèle linéaire à condition que le taux d'étirement R/L , où R est la distance entre les extrémités de l'ADN étiré, soit suffisamment élevé. Dans ce cas en effet, le mouvement de chaque bille autour de sa position d'équilibre a lieu sur des distances très petites devant la distance entre deux billes consécutives. Par conséquent, le taux d'étirement de chaque segment varie peu au cours du temps, de sorte que $f(z/L_0)$ peut être remplacé par $f(R/L)$. Si l'on décompose le mouvement transverse en modes de Fourier :

$$N X_p(t) = \sum_{n=1}^N x_n(t) \sin n p \pi / N,$$

chaque mode X_p est caractérisé par une fonction d'autocorrélation exponentielle :

$$\langle X_p(t) X_p(0) \rangle = \langle X_p^2 \rangle \exp(-t/\tau_p) . \quad (3)$$

Les amplitudes quadratiques et les temps de corrélation des fluctuations sont donnés par :

$$\langle X_p^2 \rangle = \frac{L L_p}{2\pi^2 p^2 f(R/L)} \quad ; \quad \tau_p = \frac{8\eta L_p L^2}{3\pi \ln(L_0/d) k_B T p^2 f(R/L)} . \quad (4)$$

Le détail des calculs conduisant à ces résultats est présenté dans la thèse d'A. Crut. Nos résultats expérimentaux sont en bon accord avec ces prévisions, au moins qualitativement. La figure (figure 11) représente les fonctions d'autocorrélation des trois premiers modes, évaluées pour un film typique dont la durée est de l'ordre de la minute, à raison d'une image toute les 20 ms. Ces fonctions d'autocorrélation ont été interpolées avec des fonctions exponentielles, dont on peut déduire amplitudes quadratiques et temps de corrélation. La longueur R séparant les extrémités de la molécule d'ADN a été mesurée sur la première image du film. Sur chaque image, le contour des molécules d'ADN a été interpolé à l'aide du programme fourni par Vincent Croquette. Ce contour a ensuite été décomposé en modes de Fourier.

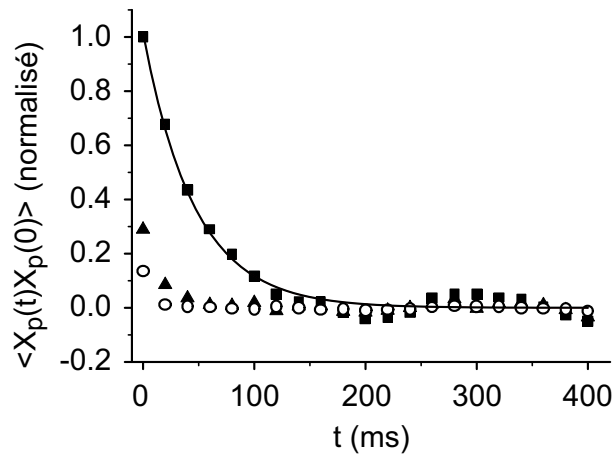


FIG. 11 – Fonctions d'autocorrélation obtenues à partir des données expérimentales pour les modes $p=1$ (■), $p=2$ (▲) and $p=3$ (○). Courbe : interpolation exponentielle pour $p=1$.

En analysant l'ensemble des films (45 films), nous avons obtenu des résultats pour les amplitudes quadratiques et les temps de corrélation qui, s'ils sont du même ordre de grandeur que ceux données par formules ci-dessus, sont malgré tout différents. Les distributions de ces grandeurs sont de plus larges. Ces écarts proviennent des cassures que peuvent subir les molécules d'ADN pendant le processus d'étirement. Ces cassures réduisent leur longueur et affectent donc les caractéristiques de leurs fluctuations transverses. Expérimentalement, elles peuvent être causées par la photodestruction des fluorophores sur l'ADN, ou par l'étirement d'un échantillon de molécules d'ADN présentant des cassures simple brin (comme c'est probablement le cas pour l'ADN commercial utilisé), donc beaucoup plus fragiles. La taille des molécules peut cependant être estimée à partir de l'amplitude des fluctuations, et la validité du modèle peut être ensuite vérifiée par l'analyse des temps de corrélation expérimentaux. Le lecteur est renvoyé à l'article en annexe ou à la thèse d'A. Crut pour les analyses et discussions afférentes. Finalement, les résultats expérimentaux obtenus, lorsque les différentes longueurs de l'ADN étiré sont prises en compte, sont en très bon accord avec le modèle proposé. L'étude de l'amplitude des fluctuations transverses permet une mesure indirecte de la taille des molécules d'ADN, et l'analyse du temps d'autocorrélation du premier mode met en lumière l'effet des non-linéarités de l'ADN, conformément au modèle bille-ressort utilisé. Nos résultats appuient ceux du groupe de S. Chu, qui s'était intéressé aux fluctuations transverses de molécules d'ADN λ dont chaque extrémité avait été fixée dans un piège optique, à condition de prendre en compte un facteur d'environ 20 dans les viscosités, les expériences de S. Chu ayant été réalisées dans des solutions très visqueuses contenant 70 % de glycérol [98]. Tous ces résultats seront indispensables à l'analyse du mouvement d'enzymes sur l'ADN étiré.

Transverse fluctuations of single DNA molecules attached at both extremities to a surface

A. Crut, D. Lasne, J.-F. Allemand, M. Dahan, and P. Desbiolles

*Laboratoire Kastler Brossel** and *Laboratoire de Physique Statistique,† Département de Physique de l'École Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, F-75005 Paris, France*

(Received 5 September 2002; revised manuscript received 10 January 2003; published 15 May 2003)

We present a simple method to stretch DNA molecules close to a surface without any chemical modification of either the molecules or the surface. By adjusting the pH of the solution, only the extremities of DNA molecules are tethered to a glass coverslip made hydrophobic, while stretching is achieved using a hydrodynamic flow. These extended molecules provide a very favorable template for DNA-protein interaction studies by purely optical means. Pursuing these experiments requires first a full characterization of the thermally driven fluctuations of the tethered DNA molecules. For this purpose, these fluctuations were recorded by fluorescence microscopy and were analyzed in terms of normal modes. Our experimental results are well described by a model accounting for the nonlinear elastic behavior of the chain. Remarkably, the proximity of the molecules to a rigid surface does not alter the main features of their dynamics, and our results are in agreement with previous studies on extended DNA in viscous solutions.

DOI: 10.1103/PhysRevE.67.051910

PACS number(s): 82.37.Rs, 83.10.Mj, 87.15.He, 87.15.Ya

I. INTRODUCTION

Over the past several years, methods intended to manipulate single DNA molecules have been extensively developed. Most of them were aimed at studying the physical properties of these natural polymers as well as their interactions with their environment. Recently, many physicists working on DNA have shown growing interest in studying interactions between DNA and proteins such as enzymes. Advances in micromanipulation techniques have enabled the observation of enzymatic action by microscopy [1,2] and the measurement of forces exerted by individual enzymes on DNA, using, notably, magnetic beads or optical tweezers [3–5] and elongation in a flow [6]. The visualization of a single fluorescently labeled protein interacting with DNA remains, however, an experimental challenge. Only a few groups have combined micromanipulation of DNA molecules and visualization of a single labeled enzyme [7,8], but at the cost of complex experimental approaches.

In most of these experiments, the stretching of DNA molecules is first required. This usually involves either high-frequency ac fields, which allow stretched molecules to be positioned close to a surface [9], or the use of at least one bead coupled to one extremity of the molecule [3–5]. Electrostatic stretch and positioning of DNA is an efficient technique, which nevertheless requires the fabrication of vacuum-evaporated microelectrodes. Additional outermost electrodes and chemical modification of both DNA and surface are apparently necessary to ensure the success of the technique [9]. Such relatively complicated surface modifications might be a serious limitation on this method when used in experiments involving DNA and proteins. The finalization

of protocols in these experiments indeed requires repetitive tests, which usually spoil the surfaces. Manipulation of DNA through surface modification should therefore avoid complex processes.

An alternative method of positioning and stretching DNA involves micrometer-sized beads, which are biochemically coupled to one or both extremities of the molecule. This technique is very fruitful but, unfortunately, the beads make the detection of a single fluorescent molecule difficult. While in epifluorescence they act as strong light scatterers, their size does not enable DNA to be set close to a surface and therefore prevents the use of evanescent wave microscopy (except with Yanagida's approach [8]).

In contrast, another technique, molecular combing, allows DNA molecules to be stretched on a surface without any chemical modification of either the molecule or the surface [10]. Recently, molecular combing was successfully applied to gene mapping using *in situ* hybridization [11] or restriction enzymes [12]. The drawbacks to this method are an overstretching of the molecules (about 150% of the initial contour length) and a strong interaction between DNA and surface, which, among other effects, inhibit the motion of enzymes along the backbone of the molecule. This technique was recently adapted to study transcription of extended DNA by a single RNA polymerase (RNAP) [13]. In this experiment, fluorescent nucleotides allowed newly synthesized RNA fragments to be detected by microscopy. Even if the dynamics of the protein were not observed, the authors convincingly demonstrated that an enzyme could work on DNA molecules stretched close to a surface. At this point, this experiment still suffers from some limitations. The mean length of molecules is difficult to adjust and it is close to the contour length of DNA. Such high stretching may alter the features of the transcription as well as those of other biological processes. Furthermore, several randomly distributed surface attachment points along combed molecules probably stopped the activity of the RNAP, and would certainly prevent the activity of other proteins.

*Unité de Recherche de l'École Normale Supérieure et de l'Université Pierre et Marie Curie, associée au CNRS.

†Unité de Recherche de l'École Normale Supérieure et des Universités Paris 6 et Paris 7, associée au CNRS.

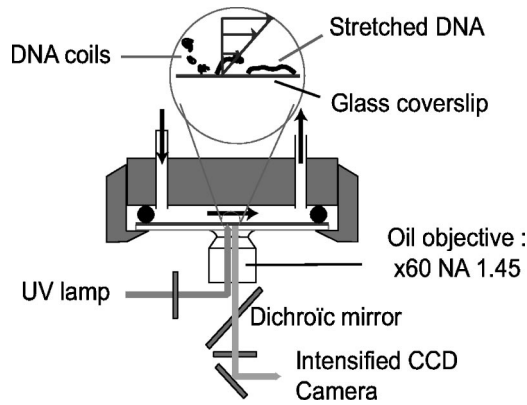


FIG. 1. Schematic representation of the experiment. DNA molecules were attached to a 22-mm-diameter glass coverslip, which formed one of the walls of a flow cell. The coverslip had been previously coated with polystyrene (5% solution in toluene) to make it hydrophobic. The gap between the two walls of the fluid chamber was about $150\ \mu\text{m}$. The cell was first incubated with 50 mM MES buffer, $\text{pH}=6.0$, for a few minutes. A solution of λ DNA in the same buffer was then injected with a flow rate of 2 ml/min. Fluorescent labeling of λ DNA was achieved by using the intercalating dye YOYO-1 (Molecular Probes). The pH of the solution was adjusted between 5.8 and 6.0 for optimal sticking of the DNA extremities. At lower pH , nonspecific sticking occurred along the molecules. After a few minutes, the cell was rinsed with the buffer. 1% β -mercaptoethanol, 200 $\mu\text{g/ml}$ glucose oxidase, 40 $\mu\text{g/ml}$ catalase, and 5 mg/ml glucose were added to the buffer to minimize photobleaching. The experiments were performed at room temperature. The chamber was placed on the top of an inverted microscope (Olympus) equipped with a X60 1.45 numerical aperture oil immersion objective. The stretched molecules were visualized using an intensified charge coupled device (CCD) camera (Pentamax, Roper Scientific).

II. EXPERIMENTAL APPROACH

Combining molecular combing and elongation in a flow, we developed a technique that allows us to tether only the two extremities of the DNA molecules to the surface. To achieve this tethering, we adjusted the pH of the solution containing DNA around 6 so that one end of a molecule would attach to a hydrophobic surface, a glass coverslip coated with polystyrene [14]. The molecule was next stretched using a hydrodynamic flow, which was maintained for a few seconds. The unbound extremity was then likely to stick to the surface (Fig. 1). Although the best results were obtained using polystyrene coated coverslips, this tethering was also achieved when using coverslips coated with PMMA (polymethylmethacrylate), PDMS (polydimethylsiloxane) or even a $150\text{-}\mu\text{m}$ -thick polystyrene sheet.

Crucially, it is possible, without untethering the molecules, to change the initial acidic morpholinoethanesulfonic (MES) acid solution for another with physiological pH , more appropriate to DNA-protein experiments (pH ranging from 7.0 to 8.0). In general, successive buffer exchanges could be done when sufficiently gentle flows were applied. The strength of the attachment of the extremities of the molecules, the absence of attachment points along the DNA, as well as the simplicity and the reproducibility of the experi-

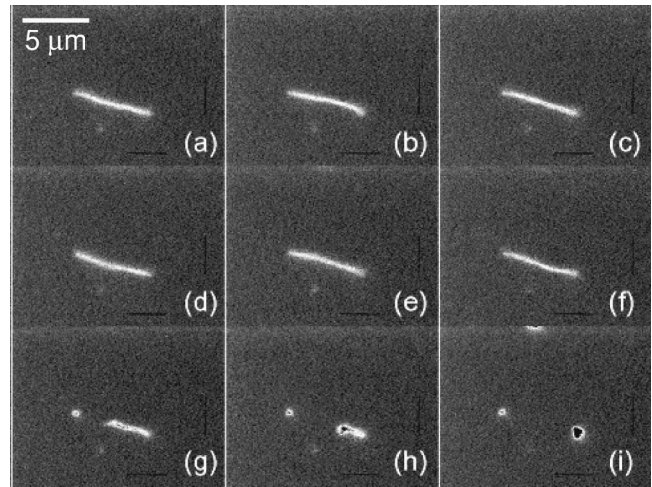


FIG. 2. (a)–(f): Thermally driven transverse fluctuations of a DNA molecule. The time between two consecutive frames is about 1 s. (g) and (h): The chain breaks, probably due to the photobleaching of the intercalating dyes and retracts because of the elasticity of the polymer. The time between these two frames is 100 ms. (i): Only the extremities of the molecule are stuck to the surface and are still visible.

mental protocol, make this method particularly attractive when compared with techniques previously mentioned.

We worked with λ -bacteriophage DNA (λ DNA), a 48,502 base-pair molecule with an $L=16\ \mu\text{m}$ contour length. Fluorescent labeling of λ DNA was achieved by using the intercalating dye YOYO-1 (Molecular Probes), at a ratio of ten base pairs per dye molecule. This process increases the contour length of the molecule, which is about $18\ \mu\text{m}$ after staining [6]. It results in only slight changes in the initial persistence length L_p of DNA, about 50 nm [15]. We noticed that the labeling of DNA by YOYO-1 is reversible, controlled by the presence of Mg^{2+} ions. Exchanging initial buffer with a solution containing Mg^{2+} ions (concentration above 5 mM), we observed that the fluorescence vanished, and did not reappear after injection of the initial buffer. A subsequent addition of YOYO-1 in a Mg^{2+} free solution allows DNA to be stained again.

The stretched molecules were observed by fluorescence microscopy, and we recorded 45 films using an intensified CCD camera (Fig. 2). The duration of a film was typically 10 s (with a time resolution of 20 ms), often limited by photobleaching. We measured on the first image of each film the end-to-end distance R of the attached molecules. The obtained value $R=7.7\pm 2.3\ \mu\text{m}$ corresponds to a relative extension of $R/L=0.43\pm 0.13$. We deduced from this extension the tension experienced by the molecules, whose value can be calculated in the wormlike chain (WLC) model [16] and estimated using a polynomial approximation [17]. A relative extension of 0.5 (0.7) is associated with a tension of 0.10 pN (0.25 pN). This tension is much smaller than the force experienced by DNA during molecular combing, about 500 pN [10]. A structural transition of the molecule during the process [18,19] is then prevented. In addition, this tension is weak compared with those exerted by enzymes, which is in the pN range [20], so that this moderate stretch-

ing should not interfere with their action.

In addition, the estimated extension R/L can be compared to previous experiments in which molecules were tethered to a surface and were stretched using a shear flow [6,21,22]. In our experiments, the Weissenberg number Wi [22], which characterizes the strength of the shear flow, ranged between 20 and 50. Based on previous experimental results, it should have yielded a relative extension between 0.5 and 0.7, larger than our measured values. This discrepancy is discussed in the last part of this paper.

III. TRANSVERSE FLUCTUATIONS

Due to the interactions with the buffer, stretched molecules exhibit thermally driven fluctuations, which were visualized in real time (Fig. 2). Full characterization of these fluctuations is essential for DNA-protein interaction experiments. For instance, the relative motion of an enzyme sliding or working on DNA needs to be differentiated from the overall motion that includes fluctuations of the chain. Similar fluctuations were observed in experiments involving DNA suspended in solution [23]. In these experiments, each extremity of a molecule was attached to a polystyrene sphere trapped in a double-optical tweezer. Recorded fluctuations were analyzed in terms of normal modes and it was shown that this analysis accounted for experimental results. The dynamics properties of extended DNA in solution were further studied [24] by taking into account the effects of tension and hydrodynamics on the fundamental relaxation time of the polymer. We follow a similar analysis in this paper. The main physical differences in our experiments are (i) molecules are close to a rigid surface and (ii) the viscosity of the buffer is about that of water [25]. We deduce from a simple model, accounting for nonlinear processes involved in the dynamics of the chain, analytical expressions for both amplitudes and correlation times. We then compare our experimental results with this model and with numerical simulations.

In order to analyze transverse fluctuations of DNA molecules, we used a ‘‘bead and spring’’ model, a common way to study polymer dynamics [26]. A DNA molecule is divided into N submolecules, called ‘‘springs’’ because of their entropic elasticity, which are connected by beads. The number N is chosen so that $L \gg L_0 \gg L_p$, where $L_0 = L/N$ is the length of a spring. The beads at the two ends of the stretched molecule are fixed, separated by length R . Although in our experiment the motion of the molecule is limited to the half-plane upon the surface, we neglect here this constraint. A Langevin equation is written for each bead

$$\zeta \mathbf{v}_n = \mathbf{T}_{n-1 \rightarrow n} + \mathbf{T}_{n+1 \rightarrow n} + \mathcal{L}_n, \quad (1)$$

where $\mathbf{T}_{n-1 \rightarrow n}$ is the elastic force exerted by the $(n-1)$ th bead on the n th bead. In the WLC model, the modulus of this force can be expressed as $T(r) = k r f(r/L_0)$, where $k = 3k_B T / 2L_p L_0$ is a spring constant (entropic elasticity of an ideal chain), r is the distance between two adjoining beads, and $f(r/L_0)$ is a function that accounts for the nonlinear elasticity of the chain [17,27,28]

$$f\left(\frac{r}{L_0}\right) = \frac{2}{3} + \frac{L_0}{6r} \left(\frac{1}{(1-r/L_0)^2} - 1 \right) + \sum_{i=2}^7 a_i \left(\frac{r}{L_0}\right)^i. \quad (2)$$

The friction force $-\zeta \mathbf{v}_n$, where ζ is the friction coefficient of a submolecule, and \mathbf{v}_n the velocity of the n th bead, is related to the random force \mathcal{L}_n through the fluctuation-dissipation theorem [26] $\langle \mathcal{L}_{n,i}(t) \mathcal{L}_{n',j}(t') \rangle = 2\zeta k_B T \delta_{ij} \delta_{nn'} \delta(t'-t)$, where i and j denote two components of \mathcal{L}_n . The friction coefficient ζ has a complex dependence on the polymer’s length and extension [24,29]. Because of the high stretching rate in our experiments, we use an expression for ζ , which corresponds to transverse friction over a rod of length L_0 and diameter d [26] $\zeta = 4\pi\eta L_0 / \ln(L_0/d)$, where η is the viscosity of the solvent (about $10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and d is the diameter of DNA (about 1 nm). In practice, the values of ζ for the coil and rod states are quite similar, and the nonlinearity of DNA elasticity has a much stronger effect than hydrodynamics on fluctuations [24,29].

To solve the set of nonlinear coupled equations (1), we assume that the mean distance R/N between two adjoining beads is large compared to the amplitudes of the transverse and longitudinal fluctuations, so that $f(r/L_0) \approx f(R/L)$. Due to this approximation, our analysis differs slightly from that described in Ref. [24] and analytic results are then available. Equation (1) then becomes linear, and corresponds to beads connected by Hookean springs with a constant $k f(R/L)$. These equations may be solved by decomposing the motion into normal modes $NX_p(t) = \sum_{n=1}^N x_n(t) \sin(np\pi/N)$, where $x_n(t)$ denotes the transverse position of the n th bead. Each mode is characterized by its autocorrelation function [26]

$$\langle X_p(t) X_p(0) \rangle = \langle X_p^2 \rangle \exp(-t/\tau_p), \quad (3)$$

where the quadratic amplitude $\langle X_p^2 \rangle$ and the correlation time τ_p are given by

$$\langle X_p^2 \rangle = \frac{L_p}{3\pi^2 p^2} \frac{L}{f(R/L)}, \quad (4)$$

$$\tau_p = \frac{8\eta L_p}{3\pi \ln(L_0/d) k_B T p^2} \frac{L^2}{f(R/L)}. \quad (5)$$

The $1/f(R/L)$ dependence of both the amplitude and time correlation is the expression of the nonlinear elastic (WLC) behavior of the DNA molecules. The quadratic amplitude of mode p does not depend on the number of beads and springs and decreases as $1/p^2$. The correlation time decreases equally as $1/p^2$, but depends slightly on L_0 . For a given mode p , τ_p and $\langle X_p^2 \rangle$ are related through $N\zeta \langle X_p^2 \rangle = k_B T \tau_p / 2$ as the time τ_p is needed for the friction to dissipate $k_B T / 2$.

IV. EXPERIMENTAL RESULTS

This normal-mode decomposition using the sine basis has been shown to be a good approximation to describe the dynamics of an extended polymer in a solution [23] and we assumed that this was still the case in our experiments. The position of the molecule was interpolated for each frame of

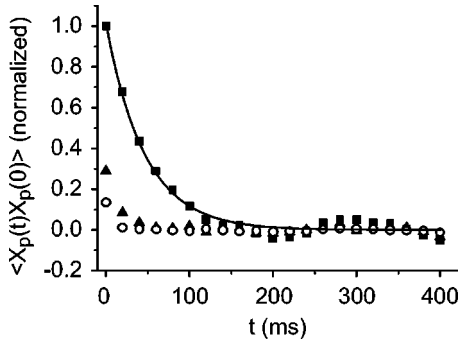


FIG. 3. Evaluation of $\langle X_p(0)X_p(t) \rangle$ for $p=1$ (■), $p=2$ (▲), and $p=3$ (○) from our experimental data. Line: exponential fit for $p=1$.

the data films and the coefficient $X_p(t)$ and the related auto-correlation function were evaluated for the first three modes (Fig. 3). As predicted by the model, the shape of the auto-correlation function is exponential. For each film, we estimated τ_p by interpolating the data with exponential functions for at least the first two modes (the decay time of the third mode is on the order of the time resolution).

Averaging over all the films leads to the following results: $\langle X_1^2 \rangle = 1.02(\pm 0.46) \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$, $\langle X_2^2 \rangle = 0.28(\pm 0.18) \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$, $\langle X_3^2 \rangle = 0.11(\pm 0.10) \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$, $\tau_1 = 101 \pm 54$ ms, and $\tau_2 = 37 \pm 20$ ms. The correlation times are in good agreement with those reported for DNA molecules extended in solution [23], taking into account a factor about 20 between the viscosities involved in both experiments. The distributions of both amplitude and correlation time are broad, as illustrated for the first mode [Fig. 4(a)]. This cannot be attributed only to the dispersion of the relative extensions R/L , which would lead to a width of the distributions on the order of 20% of their mean values. This point is discussed in the last part of this paper.

For a given molecule, the ratio between two quadratic amplitudes or correlation times for different modes depends on p^2 but not on L , nor on R/L . In our experiments, the ratios $\langle X_1^2 \rangle / \langle X_2^2 \rangle$ and $\langle X_1^2 \rangle / \langle X_3^2 \rangle$ are, respectively, equal to 4.2 ± 1.0 [Fig. 4(b)] and 10.9 ± 3.4 , in agreement with the expected values 4 and 9. The ratio between the times τ_1 and τ_2 is 2.9 ± 0.9 , close to the expected value 4.

We compared the measured values of both amplitude and correlation time for the first mode with those expected from our bead and spring model. For $R/L = 0.43$, $f(R/L)$ is ap-

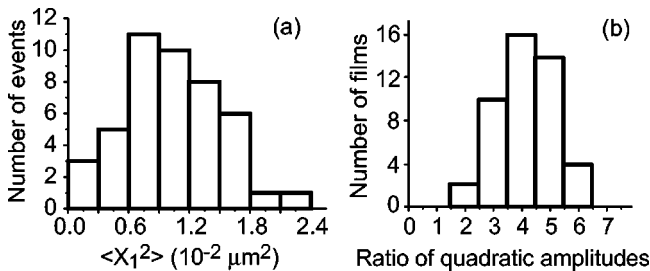


FIG. 4. Distribution of (a) amplitudes for the mode $p=1$ and (b) ratios of the quadratic amplitudes $\langle X_1^2 \rangle / \langle X_2^2 \rangle$.

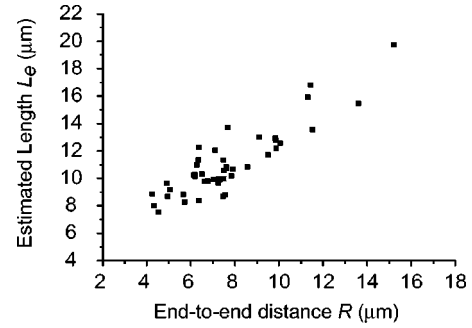


FIG. 5. ■: estimated length L_e as a function of the distance R . L_e is derived from the experimental values of the quadratic amplitude $\langle X_1^2 \rangle$ and the end-to-end distance R (measured on the first image of each film). The estimated length is proportional to R , illustrating a moderately dispersed relative extension.

proximately equal to 1.5, and the model leads to $\langle X_1^2 \rangle = 2 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$ and $\tau_1 \approx 330$ ms, values that are larger than our experimental results. To account for this discrepancy, we assumed that molecules may have broken during the experiments. Direct observation of DNA molecules supports this hypothesis, which would furthermore explain the small mean extension R measured, as well as the broad distributions reported for both amplitudes and correlation times. Damage to molecules might result from residual photobleaching or during injection in the flow cell.

Under the assumption that DNA molecules may have different lengths, we determined for each of them its contour length L_e . For that purpose, we used the experimental value of the quadratic amplitude $\langle X_1^2 \rangle$ and the measured end-to-end distance R . These two quantities enabled us to directly derive L_e from relation (4), assuming that our model provides a reliable expression for the quadratic amplitude of the observed fluctuations. Amplitudes are suitable for this analysis because they do not depend on the hydrodynamic parameters, unlike time correlations. Most of the contour lengths L_e were found to be smaller than $18 \mu\text{m}$ in accordance with our assumption (Fig. 5). We then deduced the relative extension R/L_e for each molecule and calculated its mean value $\overline{R/L_e} = 0.69(\pm 0.10)$. This value is larger than that calculated with a constant contour length and is consistent with those expected from estimated Weissenberg numbers. In addition, the standard deviation is smaller than previously, illustrating a good control of the strength of the shear flow in our experiments.

We then plotted τ_1/L_e^2 as a function of R/L_e (Fig. 6). Experimental values strongly decrease with R/L_e , demonstrating the crucial role of nonlinearities in the chain dynamics. Furthermore, our results correlate with the $1/f(R/L)$ shape predicted by our bead and spring model.

V. NUMERICAL SIMULATIONS

To estimate the pertinence of the assumption underlying our analysis (i.e., the mean distance R/N between two adjacent beads is large compared to the amplitude of the transverse and longitudinal fluctuations) as well as to partially

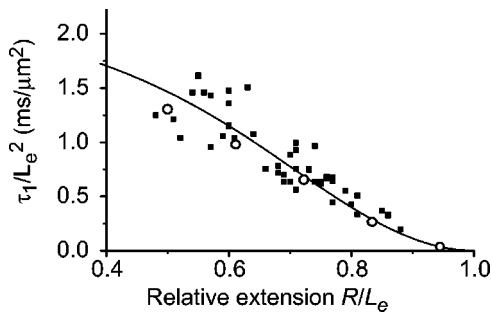


FIG. 6. ■: τ_1/L_e^2 as a function of R/L_e . The continuous line is the result of the bead and spring model. ○: numerical simulations of τ_1/L^2 as a function of R/L (calculated for $L = 18 \mu\text{m}$). To fit our data, the same multiplicative factor 1.6 was applied to both the results of the model and the simulation. This factor is likely due to a limited knowledge of the hydrodynamic parameters, which are probably altered by the proximity to the surface.

estimate the role played by the surface, we performed simulations. They were computed using ten submolecules (we checked that simulations with a larger number of beads gave the same results). The elasticity of each submolecule was calculated using the nonlinear expression of the function $f(r/L_0)$. The surface can alter the dynamics of the molecule in two distinct ways: (i) a mechanical effect, the motion of the molecule being restricted to a half space; (ii) a hydrodynamical effect, through a modification of the properties of the fluid surrounding the molecule. While the latter, complex and beyond the scope of this paper, was not included in the simulations, we took the former into account by considering the surface as an infinite potential on which beads bounced elastically. Interestingly, we did not find it had noticeable effects on the results of the simulations, either in the amplitude or in the correlation time. As long as $R/L \geq 0.5$, the numerical results differed by less than 10% from the results provided by the model (Fig. 6). In the low-extension limit, which was not experimentally explored, the amplitude of the fluctuations is not small compared to R/N , and $f(r/L_0)$ cannot be approximated by $f(R/L)$.

VI. CONCLUSION

We report a simple and efficient method to attach and stretch DNA molecules to a surface without chemical modi-

fication of either the molecule or the surface. This method can be applied to various hydrophobic surfaces, such as polystyrene, PMMA, or PDMS. This last point is of particular interest, since more and more experiments are pursued in microfluidic environment involving home-made PDMS cavities. The possibility of observing several extended molecules simultaneously on the same surface could lead to parallel analyses of biological processes. Furthermore, the simplicity and the reproducibility of this method make it particularly attractive when compared with usual techniques involving ac fields or micrometer-sized beads.

We recorded the thermally driven fluctuations of the stretched molecules, which are described and analyzed in terms of normal modes. We deduced from the amplitudes of these fluctuations the length of extended molecules. We then showed that the dependence of the first mode correlation time on relative extension is in agreement with a model taking into account the nonlinearities of the chain, an essential point for understanding the transverse fluctuations of the polymers. These results are in good agreement with previous studies, where DNA molecules were extended in a viscous solution. Performing numerical simulations, we confirmed that the proximity of the molecules to a rigid surface does not significantly alter the main features of their dynamics.

This experimental technique and our analysis should be useful in the future study of DNA-protein interactions. A main feature of our system is that the free part of the tethered DNA is in average a few hundred nanometers from the coverslip. Although the DNA molecule may get closer owing to thermally driven fluctuations, we expect this proximity to be momentary and the surface interaction to be weak enough to preserve the activity of a molecular complex. Furthermore, the mean distance between DNA and the surface being on the order of an optical wavelength, our method is well adapted for the visualization by evanescent-wave microscopy of enzymes moving along DNA. This ability is specially appealing since the concentration of fluorescently labeled enzymes can be kept high enough to ensure DNA-protein interactions, while maintaining single molecule sensitivity.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Bouchiat for valuable discussions, and V. Croquette for helping us with the film analysis.

-
- [1] K.M. Dohoney and J. Gelles, *Nature (London)* **409**, 370 (2001).
 - [2] P.R. Bianco, L.R. Brewer, M. Corzett, R. Balhorn, Y. Yeh, S.C. Kowalczykowski, and R.J. Baskin, *Nature (London)* **409**, 374 (2001).
 - [3] S.B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante, *Science (Washington, DC, U.S.)* **258**, 1122 (1992).
 - [4] M.D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S.M. Block, *Biophys. J.* **72**, 1335 (1997).
 - [5] T.R. Strick, V. Croquette, and D. Bensimon, *Nature (London)* **404**, 901 (2000).
 - [6] T.T. Perkins, S.R. Quake, D.E. Smith, and S. Chu, *Science (Washington, DC, U.S.)* **264**, 822 (1994).
 - [7] H. Kabata, O. Kurosawa, I. Arai, M. Washizu, S.A. Margaron, R.E. Glass, and N. Shimamoto, *Science (Washington, DC, U.S.)* **262**, 1561 (1993).
 - [8] Y. Harada, F. Funatsu, K. Murakami, Y. Nonoyama, A. Ishihama, and T. Yanagida, *Biophys. J.* **76**, 709 (1999).
 - [9] M. Washizu, O. Kurosawa, I. Arai, S. Suzuki, and N. Shimamoto, *IEEE Trans. Ind. Appl.* **31**, 447 (1995).
 - [10] D. Bensimon, A.J. Simon, V. Croquette, and A. Bensimon, *Phys. Rev. Lett.* **74**, 4754 (1995).

- [11] X. Michalet, R. Ekong, F. Fougerousse, S. Rousseaux, C. Schurra, N. Hornigold, M. van Slegtenhorst, J. Wolfe, S. Povey, J.S. Beckmann, and A. Bensimon, *Science* (Washington, DC, U.S.) **277**, 1518 (1997).
- [12] H. Yokota, F. Johnson, H. Lu, R.M. Robinson, A.M. Belu, M.D. Garrison, B.D. Ratner, B.J. Trask, and D.L. Miller, *Nucleic Acids Res.* **25**, 1064 (1997).
- [13] Z. Gueroui, C. Place, E. Freyssingeas, and B. Berge, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6005 (2002).
- [14] J.-F. Allemand, D. Bensimon, L. Jullien, A. Bensimon, and V. Croquette, *Biophys. J.* **73**, 2064 (1997).
- [15] P.J. Hagerman, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 265 (1988).
- [16] C. Bustamante, J.F. Marko, E.D. Siggia, and S. Smith, *Science* (Washington, DC, U.S.) **265**, 1599 (1994).
- [17] C. Bouchiat, M.D. Wang, J.-F. Allemand, T. Strick, S.M. Block, and V. Croquette, *Biophys. J.* **76**, 409 (1999).
- [18] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.-L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron, *Science* (Washington, DC, U.S.) **271**, 792 (1996).
- [19] S.B. Smith, Y. Cui, and C. Bustamante, *Science* (Washington, DC, U.S.) **271**, 795 (1996).
- [20] M.D. Wang, M.J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S.M. Block, *Science* (Washington, DC, U.S.) **282**, 902 (1998).
- [21] T.T. Perkins, D.E. Smith, and S. Chu, *Science* (Washington, DC, U.S.) **276**, 2016 (1997).
- [22] P.S. Doyle, B. Ladoux, and J.-L. Viovy, *Phys. Rev. Lett.* **84**, 4769 (2000).
- [23] S.R. Quake, H. Badcock, and S. Chu, *Nature* (London) **388**, 151 (1997).
- [24] J.W. Hatfield and S.R. Quake, *Phys. Rev. Lett.* **82**, 3548 (1999).
- [25] In previous studies, addition of glycerol in the solution led to an increase in the effective time resolution of the experiment through an increase in the viscosity.
- [26] M. Doi and S. F. Edwards, *The Theory of Polymer Dynamics* (Oxford Science, Oxford, 1986).
- [27] T.T. Perkins, D.E. Smith, R.G. Larson, and S. Chu, *Science* (Washington, DC, U.S.) **268**, 83 (1995).
- [28] The coefficients of the polynomial approximation are $a_2 = -0.516\,422\,8$, $a_3 = -2.737\,418$, $a_4 = 16.074\,97$, $a_5 = -38.876\,07$, $a_6 = 39.499\,44$, $a_7 = -14.177\,18$.
- [29] R.G. Larson, T.T. Perkins, D.E. Smith, and S. Chu, *Phys. Rev. E* **55**, 1794 (1997).

3.3 Détection de l'ADN à l'aide de nanocristaux semi-conducteurs

Cette étude, menée en collaboration avec Christophe Escudé, se proposait de détecter des molécules d'ADN peignées en attachant des NCs à leurs extrémités. La détection de longues molécules d'ADN (plusieurs kilobases) avec des NCs n'avait jamais été réalisée auparavant à notre connaissance. Ce mode de détection présente de nombreux avantages par rapport à une détection utilisant des fluorophores organiques, comme un intercalant (YOYO-1) ou une molécule s'insérant dans un sillon de l'ADN (SYBR) :

- Le photoblanchiment des composés organiques limite la durée d'observation des molécules d'ADN et conduit à leur cassure. La durée d'observation des molécules d'ADN peut être augmentée en éliminant l'oxygène présent en solution. Néanmoins, la durée maximale d'observation reste limitée à quelques minutes, et ce système n'agit pas dans toutes les conditions expérimentales ; son efficacité est par exemple très réduite à des $\text{pH} \geq 8$.
- L'interaction de ces fluorophores avec l'ADN est d'origine électrostatique. Il est donc affecté par la salinité de la solution utilisée. Nous avons observé que le YOYO-1 et le SYBR ne teignent plus l'ADN pour des concentrations de Mg^{2+} supérieures à 5 mM et en NaCl supérieures à 200 mM. Or ces ions sont indispensables à l'action de très nombreuses enzymes et à leur étude.
- Les molécules d'ADN liées à des fluorophores subissent des modifications structurales, électrostatiques et mécaniques. L'interaction ADN-protéine dans ces nouvelles conditions peut alors être modifiée, voire empêchée [99, 100].

Dans la section suivante, nous verrons que nous sommes néanmoins parvenus à observer l'interaction d'EcoRV avec un ADN marqué au SYBR Gold. Nous nous sommes placés dans des conditions particulières pour cela. En effet, nous n'avons pas eu besoin d'observer l'ADN de manière prolongée, et nous avons utilisé un fluorophore (le SYBR Gold) qui n'empêche pas l'action d'EcoRV, dans des conditions salines compatibles avec la visualisation de l'ADN (faible salinité, pas de Mg^{2+}). Néanmoins, l'étude des interactions ADN-protéines pourrait devenir problématique avec d'autres protéines ou avec des solutions utilisées différentes, notamment en présence d'ions Mg^{2+} à des concentrations proches des concentrations cellulaires, de l'ordre de 10 mM. Notre méthode de détection des molécules d'ADN permet de s'affranchir des problèmes répertoriés ci-dessus. Nous avons pour cela synthétisé des molécules d'ADN modifiées chimiquement à leurs extrémités. Après peignage, ces extrémités peuvent être détectées à l'aide de nanocristaux. Les couleurs des NCs utilisés peuvent être différentes, de manière à déterminer l'orientation des molécules.

Substrat ADN

La détection de molécules d'ADN par des NCs nécessite la conception et la fabrication de substrats d'ADN dont les extrémités ont une affinité forte pour les NCs. Nous avons donc ligué des fragments d'ADN (d'environ 500 kilobases) contenant des nucléotides modifiés (avec biotine ou digoxigénine) aux extrémités des molécules d'ADN d'intérêt. Après peignage, ces fragments peuvent ensuite être révélés grâce à des NCs couverts de streptavidine (notés NCs-streptavidine) ou des NCs couverts d'anticorps. Notre protocole permet de contrôler la taille des fragments ligués, et offre également la possibilité d'incorporer un nombre élevé et connu de nucléotides modifiés. Il a donc été préféré à d'autres protocoles plus courts, comme la polymérisation directe, par une polymérase de Klenow, de quelques nucléotides modifiés aux extrémités des molécules d'ADN, qui ne présentaient pas ces avantages. Le lecteur trouvera les protocoles détaillés dans

l'article correspondant en annexe.

Attachement des NCs sur les molécules d'ADN peignées

Deux voies s'offraient à nous au début de ce projet : attacher des NCs aux extrémités de l'ADN puis peigner ces molécules (1), ou procéder dans l'ordre inverse et attacher des NCs sur des molécules déjà peignées (2). La réalisation de (1) nous a semblé présenter des obstacles beaucoup plus grands que celle de (2). En effet, un nanocrystal étant susceptible de se lier avec plusieurs groupements biotine (pouvant appartenir à des extrémités de molécules d'ADN différentes), l'expérience doit être conduite en large excès de NCs pour éviter le cross-linking des molécules d'ADN ce qui pose le délicat problème de leur purification ultérieure. De plus, il est expérimentalement difficile de trouver des conditions dans lesquelles on puisse peigner les molécules d'ADN tout en évitant une interaction importante des NCs avec la surface. Une fois conçu et fabriqué l'ADN décrit précédemment, le protocole (2) ne présente plus qu'une difficulté : déterminer des conditions expérimentales dans lesquelles l'adsorption non-spécifique des NCs est la plus faible possible.

Traitement des lames contre l'adsorption non spécifique des nanocristaux

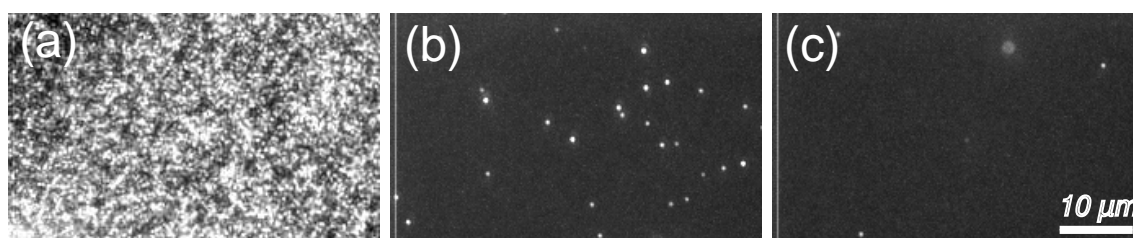


FIG. 12 – Adsorption des nanocristaux-streptavidine 605 nm sur des lames sans/avec traitement des lames avec une solution de caséine. Dans les 3 cas les lames sont recouvertes pendant 10 min de 100 μ l d'une solution de nanocristaux (à 2 nM dans le tampon Borate 40 mM pH 8.3, NaCl 100 mM) puis rincées avec le tampon Borate 40 mM pH 8.3. (a) En l'absence de traitement préalable, la lame de verre+polystyrène est recouverte de nanocristaux (b) Après un traitement de la lame avec 1.5 mg/ml de "Blocking Reagent", seuls quelques spots de nanocristaux sont visibles sur la surface (c) Quand le "Blocking Reagent" est en plus ajouté (à 0.3 mg/ml) dans la solution de nanocristaux, l'adsorption non-spécifique des nanocristaux est quasiment supprimée.

En l'absence de traitement, les NCs s'adsorbent massivement sur les surfaces, aussi bien hydrophiles (lame de verre non traitée) qu'hydrophobes (lame de verre recouverte de polystyrène). Une étape de traitement des surfaces est donc nécessaire. Les premiers essais utilisant des solutions diluées de BSA ou le "tampon d'incubation" fourni et recommandé par Quantum Dots Corporation ont conduit à des résultats peu concluants. En revanche, l'utilisation de solutions diluées de caséine ("Blocking Reagent", Roche) supprime presque entièrement l'adsorption non-spécifique des nanocristaux sur la surface (figure 12).

Résultats

Après incubation et rinçage, nous sommes parvenus à marquer spécifiquement les extrémités de l'ADN peigné. Des images réalisées à partir de molécules d'ADN présentant une extrémité biotine, une extrémité digoxigénine, deux extrémités biotine ou une extrémité biotine et une extrémité digoxigénine sont représentées sur la figure 13. La figure 14 illustre la différence de photostabilité d'un fluorophore organique comme le YOYO-1 et des nanocristaux. La fluorescence des molécules d'ADN teintées au YOYO-1 décroît progressivement au cours du temps, alors que ce n'est pas le cas pour les nanocristaux.

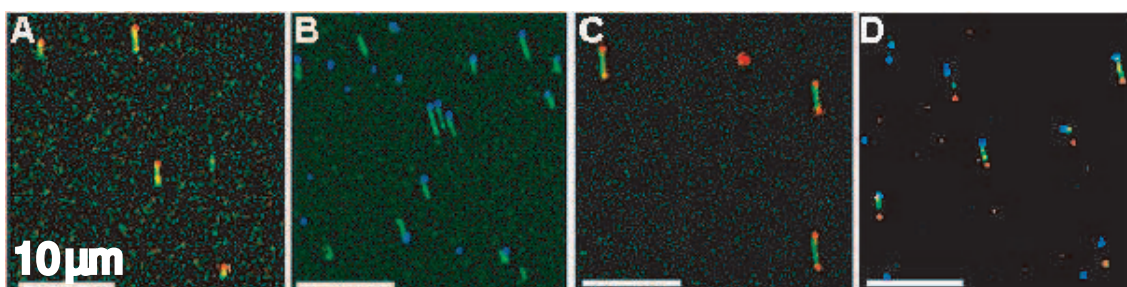


FIG. 13 – Détection des molécules d'ADN peignées (images superposées d'ADN et NC). L'ADN est marqué au YOYO-1 (en vert). Les extrémités biotine sont détectées avec des NCs-streptavidine 565 (D) ou 605 (A et C) (en rouge). Les extrémités digoxigénine sont détectées avec de l'anti-digoxigénine de souris puis des NC anti-souris 655 (B et D) (en bleu). Quatre types d'ADN ont été utilisés : une extrémité biotine (A), une extrémité digoxigénine (B), deux extrémités biotine (C), une extrémité biotine et une extrémité digoxigénine (D) (barres : 10 μm).

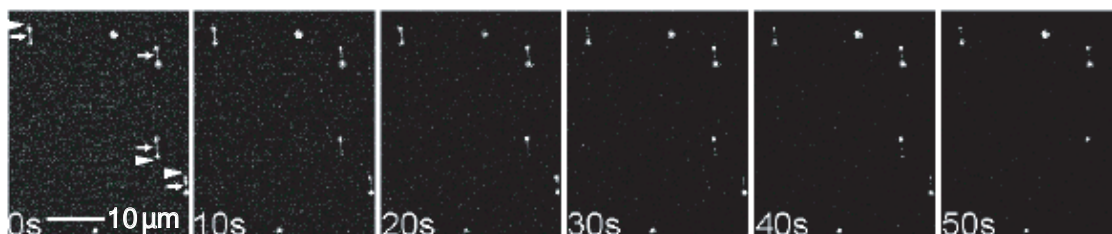


FIG. 14 – Observation simultanée de molécules d'ADN et de nanocristaux. Les molécules d'ADN ont été liées à deux extrémités biotine, marquées au YOYO-1 et peignées. Les extrémités sont détectées avec des nanocristaux streptavidine à 605 nm. Un film de 60 images (temps d'exposition : 1 s) est réalisé au moyen d'un filtre d'émission passe-long. Comme le montrent les images extraites de ce film, la fluorescence des molécules d'ADN marquées au YOYO-1 diminue au cours du temps (flèches) et ne peut plus être observée après quelques dizaines de secondes, alors que les NCs (triangles) ne sont sujets qu'à un clignotement intermittent.

Nous avons déterminé, pour chaque type de couplage, l'efficacité de détection de l'ADN peigné en colocalisant NCs et ADN marqué au SyBr. Lorsque l'ADN possède une seule extrémité biotine, environ 60 % des molécules peignées sont marquées avec un nanocristal. Dans 90% des cas, les NCs colocalisés avec l'extrémité d'une molécule d'ADN sont situés à son extrémité supérieure,

qui est la première à s'être accrochée à la surface pendant le processus de peignage. Cette observation suggère que les extrémités modifiées s'accrochent de manière privilégiée à la surface. Un tel effet avait déjà été observé dans l'équipe avec des molécules d'ADN liées à des triples-hélices [101]. Lorsque l'ADN possède une extrémité digoxigénine, la détection s'est faite en deux étapes : l'ajout d'anti-digoxigénine de souris puis de NCs anti-souris. Là encore, environ 60 % des molécules peignées sont marquées avec un nanocrystal, situé dans la plupart des cas à l'extrémité supérieure, comme pour le marquage biotine.

Lorsque les deux extrémités de l'ADN possèdent un fragment modifié, la proportion de molécules dont les deux extrémités sont colocalisées avec des NCs est d'environ 50%. Pour 40% des molécules, une seule extrémité est marquée, les résultats étant à nouveau comparables pour les deux types de marquage. Dans le cas du marquage mixte biotine/digoxigénine, environ la moitié de ces molécules est marquée à son extrémité biotine, l'autre moitié à son extrémité digoxigénine. Ces résultats sont relativement cohérents avec la probabilité de détection de $P=60\%$ d'une seule extrémité modifiée mesurée précédemment, qui mènerait à des probabilités respectivement égales à 36 % et 48 % pour la détection de respectivement deux et un NC(s) aux extrémités des molécules d'ADN. Dans le cas d'un marquage mixte, nous avons observé que les molécules d'ADN s'étaient, dans 90 % des cas, accrochées initialement par l'extrémité digoxigénine pendant la phase de peignage. Les extrémités digoxigénine ont donc une affinité plus forte pour la surface que les extrémités biotine. Le fait que l'efficacité de détection mesurée soit de l'ordre de 60 %, bien inférieure à 100 %, ne peut être expliqué par le rendement (supérieur à 95 %) de la ligation des fragments de PCR aux extrémités du plasmide linéarisé. En revanche, aucun indice expérimental ne permet d'établir avec certitude que les molécules d'ADN peignées considérées sont entières, la taille apparente de molécules d'ADN peignées identiques étant soumise à d'importantes fluctuations. Il est donc possible qu'une partie des statistiques ait été effectuée sur des molécules non entières, de sorte que l'efficacité réelle de détection des extrémités modifiées pourrait dépasser les valeurs précédentes. Enfin, le clignotement fréquemment observé pour les spots situés aux extrémités des molécules d'ADN indique que ces spots sont généralement composés d'un ou de quelques NCs.

Nous avons ensuite examiné dans quelle mesure les molécules d'ADN pouvaient être localisées par l'analyse des images de NCs, en repérant les paires de NCs telles que 1) la distance entre les deux fluorophores correspondait à la longueur de l'ADN peigné (soit $3\ \mu$) et 2) leur orientation correspondait à la direction de peignage. Le détail de la procédure suivie est exposé dans l'article en annexe, le résultat essentiel est que dans le cas d'un marquage avec deux extrémités biotine, on retrouve de l'ADN entre les paires détectées avec une probabilité de 96 % pour l'ADN. Cette probabilité est égale à 63 % pour l'ADN mixte biotine-digoxigénine.

Enfin, l'ensemble du protocole de marquage a été reproduit pour des molécules d'ADN non plus peignées mais étirées. Nous avons malheureusement obtenus pour l'instant des résultats décevants, sans qu'il nous soit possible de trouver la cause exacte de la faible proportion de molécules étirées marquées.

Detection of single DNA molecules by multicolor quantum-dot end-labeling

Aurélien Crut¹, Bénédicte Géron-Landre², Isabelle Bonnet¹, Stéphane Bonneau^{1,3}, Pierre Desbiolles¹ and Christophe Escudé^{2,*}

¹Laboratoire Kastler Brossel, Unité de Recherche de l'École Normale Supérieure et de l'Université Pierre et Marie Curie, associée au CNRS, Département de Physique, 24 rue Lhomond, F-75005 Paris, France,

²Laboratoire 'Régulation et Dynamique des Génomes', Département 'Régulations, Développement et Diversité Moléculaire', USM 0503 Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS UMR5153, INSERM U565, Case Postale 26, 43 rue Cuvier, F-75231 Paris Cedex 05, France and ³CEREMADE, Université Paris IX -Dauphine, F-75775 Paris, France

Received April 13, 2005; Revised and Accepted May 31, 2005

ABSTRACT

Observation of DNA–protein interactions by single molecule fluorescence microscopy is usually performed by using fluorescent DNA binding agents. However, such dyes have been shown to induce cleavage of the DNA molecule and perturb its interactions with proteins. A new method for the detection of surface-attached DNA molecules by fluorescence microscopy is introduced in this paper. Biotin- and/or digoxigenin-modified DNA fragments are covalently linked at both extremities of a DNA molecule via sequence-specific hybridization and ligation. After the modified DNA molecules have been stretched on a glass surface, their ends are visualized by multicolor fluorescence microscopy using conjugated quantum dots (QD). We demonstrate that under carefully selected conditions, the position and orientation of individual DNA molecules can be inferred with good efficiency from the QD fluorescence signals alone. This is achieved by selecting QD pairs that have the distance and direction expected for the combed DNA molecules. Direct observation of single DNA molecules in the absence of DNA staining agent opens new possibilities in the fundamental study of DNA–protein interactions. This work also documents new possibilities regarding the use of QD for nucleic acid detection and analysis.

INTRODUCTION

Over the past several years, single-molecule experiments have provided new insights into the dynamics and function of DNA. The physical properties of this natural polymer have been investigated in detail, and there is a growing interest in understanding its interactions with proteins (1). Single molecule studies of DNA typically involve enzymatic reactions along extended molecules. These molecules are stretched by anchoring one end so that individual DNA segments can be extended and manipulated by various small forces such as electric or dielectric force, viscous drag, surface tension, magnetic force or optical force (2). One method for manipulating DNA is to attach latex or magnetic beads to the molecules. The movement of these beads also allows one to deduce the magnitude of the force exerted on the molecules. Another approach consists of visualizing the entire DNA molecule after staining with a fluorescent dye such as the cyanine dimer YOYO-1 or the groove binding agent SybrGreen. The processes of condensation, denaturation and cleavage of the DNA shorten the molecules sufficiently to be visible, thereby permitting the observation of the action of a protein without visualizing the protein itself. This approach has been used to study chromatin assembly (3), digestion by exonucleases (4) and endonucleases (5), and denaturation induced by DNA helicases (6).

In the absence of DNA staining organic dyes, observation of enzymatic activity is still possible. A helicase activity has been studied by using a combination of a surface immobilization scheme and fluorescence resonance energy transfer between two short end-labeled oligonucleotides (7). Another approach consists in observing the incorporation of fluorescently

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 1 40793774; Fax: +33 1 40793705; Email: escude@mnhn.fr
Correspondence may also be addressed to Pierre Desbiolles. Tel: +33 1 44323380; Fax: +33 1 44323434; Email: pierre.desbiolles@lkb.ens.fr

The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors

© The Author 2005. Published by Oxford University Press. All rights reserved.

The online version of this article has been published under an open access model. Users are entitled to use, reproduce, disseminate, or display the open access version of this article for non-commercial purposes provided that: the original authorship is properly and fully attributed; the Journal and Oxford University Press are attributed as the original place of publication with the correct citation details given; if an article is subsequently reproduced or disseminated not in its entirety but only in part or as a derivative work this must be clearly indicated. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oupjournals.org

labeled nucleotides. This has been done in two separate studies for DNA (8) and for RNA (9) polymerases. In both studies, DNA was elongated in a process resembling molecular combing. This commonly used technique extends DNA molecules linearly on a modified glass surface using a receding meniscus (10). This method has proven extremely useful for molecular cytogenetics or DNA replication studies. Nevertheless, the level of overstretching (which can reach 50%) and the way the DNA molecule is attached to the surface are critical factors when combed DNA molecules are used as substrate for DNA binding proteins. We have recently devised a method derived from molecular combing whereby a DNA molecule, one end of which is attached to a surface, is elongated by a water stream. The other end also eventually attaches to the surface (11) resulting in an elongated, but not overstretched molecule, the majority of which is free of the surface.

This study and others emphasized two main drawbacks of the use of DNA staining agents. The first is a decrease of fluorescence over time (photobleaching). This process results in the release of free radicals which induce cleavage of the double-stranded DNA molecule. Although the duration of fluorescence can be extended by reducing light intensity and/or using oxygen radical scavengers, dynamic studies of DNA-protein interactions require high illumination intensity and long observation times to achieve both spatial and temporal resolutions. The second drawback is that the presence of these dyes results in changes in the electrostatic, structural and mechanical properties of DNA which are likely to modify its interaction with proteins. Enzymatic inhibition has been reported for restriction endonucleases (5,12) or exonucleases (4). Moreover, these dyes are flushed away from DNA under sodium and magnesium concentrations consistent with enzymatic activity (13). These limits constrain the use of this labeling method for DNA-protein interaction studies.

Direct observation of a fluorescently labeled protein acting on dye-free DNA has been reported only twice to our knowledge (14,15). In the first study, the movements of an RNA polymerase were examined on a bundle of electrically aligned DNA molecules. Sliding of the proteins along the DNA molecules resulted in the deviation of proteins from bulk flow. In the second study, total internal reflection microscopy was used to observe the interactions of an RNA polymerase with a DNA molecule which was positioned and elongated on an engineered surface by using two optical traps. The complexity of these experimental approaches plausibly explains why they were not further exploited. Visualization of fluorescently labeled proteins interacting with combed DNA molecules would present an interesting alternative if performed in the absence of DNA staining agents.

In this paper, we report a new strategy for localizing single DNA molecules in the absence of DNA-binding organic fluorophores. The DNA molecules are labeled with biotin or digoxigenin at both ends before they are combed onto a glass surface. The detection scheme uses streptavidin- or antibody-conjugated fluorescent quantum dots (QD). The use of two different colored labels provides information regarding the orientation of DNA molecules. Scanning of the surface and selection of spatially concordant QD pairs can be used to detect DNA molecules in the absence of organic dye.

MATERIALS AND METHODS

DNA preparation

The following primers were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium): 5'-CGCTTGGTCTCTGGGACGGTAT-CAGCTCACTCAAAG-3' (fwB), 5'-CGCTTGGTCTCTCT-GGCGGTATCAGCTCACTCAAAG-3' (fwD) and 5'-GGC-GATAAGTCGTGTCTTAC-3' (rv). Primer fwB carries a biotin at the 5' end and primer fwD carries a digoxigenin. Their concentration was calculated using a nearest-neighbor model for absorption coefficients. DNA fragments containing multiple biotin or digoxigenin were synthesized by PCR by mixing the fwD or fwB, respectively primer and the rv primer (1.6 μ M each) in 50 μ l of Taq buffer (Promega) with 2 mM $MgCl_2$; 50 μ M of dATP, dCTP and dGTP each; 33 μ M of dTTP; 17 μ M of biotin-dUTP or digoxigenin-dUTP, respectively (Roche); 10 pg/ μ l of pBluescript SK+ as a template; and 0.1 U/ μ l of Taq polymerase (Promega). After 30 cycles of amplification in three stages (30 s at 94°C, 30 s at 61°C and 1 min at 72°C, increasing the last stage by 10 s per cycle) and a concluding extension of 10 min at 72°C, primers and unincorporated dNTP were removed using PCR purification kits (Qiagen). Then the PCR products were digested overnight at 50°C with 50 U BsaI (New England Biolabs) in a total volume of 50 μ l. The modified extremities and the non-digested fragments were removed using anti-digoxigenin- or streptavidin-coated magnetic beads (Dynabeads) for the biotin- and digoxigenin-modified fragments, respectively. The labeled fragments were then ethanol precipitated and quantified on an agarose gel containing ethidium bromide. The number of biotin or digoxigenin incorporated into the DNA fragment should be 75 based on a best efficiency calculation. This number was corroborated by measurements obtained with a dot-blot assay, as described in (16). Briefly, different concentrations of the DNA fragments that contained biotin or digoxigenin were spotted on a nylon membrane (Hybond N+, Amersham). Biotin or digoxigenin were detected with streptavidin or anti-digoxigenin linked to alkaline phosphatase (Roche), respectively. Alkaline phosphatase was then detected by a colorimetric assay using nitro-blue-tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine salt (Roche). The number of incorporated modified nucleotides was evaluated by comparison with various dilutions of a standard sample of known concentration, which consisted of either an oligonucleotide or the same DNA fragment carrying a single biotin or digoxigenin attached to its 5' end. This assay provided a number of incorporated modified nucleotides between 50 and 100. A fragment that contained fewer biotin was also prepared using the same protocol except that the PCR was carried out in the presence of 50 μ M dTTP and 2 μ M biotin-dUTP, i.e. the solution contained nine times less biotin. The dot blot assay provided evidence for 5–10 incorporations in this case. Another biotin-containing fragment was synthesized by using the fwB primer, i.e. in order to produce a biotin-modified fragment that has the same cohesive end as the digoxigenin-modified fragment. In this case, the modified extremity was removed using a PCR purification kit (Qiagen).

Labeled fragments were ligated to the 6.3 kb DNA by incubating 25 ng (7.5 nM) of labeled fragments with 100 ng of 6.3 kb DNA (2.5 nM) and 100 U of T4 DNA ligase (New England Biolabs) in 10 μ l of the recommended buffer

overnight at 20°C. Removal of excess labeled fragments was performed using the previously described spermidine precipitation procedure (16). Briefly, the ligation mix was diluted to a final volume of 50 μ l in a buffer containing 40 mM Tris, pH 8.0, 80 mM NaCl and 16 mM MgCl₂. Then, 50 μ l of 40 mM ice-cold spermidine were added. The sample was incubated for 30 min at room temperature and centrifuged for 15 min at 14 000 r.p.m. The resulting pellet was rinsed with 100 μ l of a 1:1 v:v mix of isopropanol and a solution containing 600 mM NaCl, 20 mM MgCl₂ and 50 mM EDTA. It was resuspended in 10 μ l of TE supplemented with 1.5 μ M YOYO-1 (Molecular Probes) at a ratio of 1–10 bp.

Combing and detection of DNA molecules

DNA combing was carried out on hydrophobic glass coverslips at low pH. Coverslips were first cleaned using a Plasma Cleaner (Harrick Scientific, USA). They were then spin-coated with polystyrene (5% w:v in toluene) and baked at 100°C for at least 1 h. Ten nanograms of YOYO-1 stained DNA (at a dye to bp ratio of 1–10) were added in a reservoir containing 3 ml of 50 mM MES, pH 5.5, 1 mM EDTA. Combing was achieved by dipping a coverslip into the reservoir for 5 min and then slowly removing. At appropriate pH, DNA molecules in the reservoir bind to the coverslip's surface by one of their extremities. As the coverslip is pulled up out of the reservoir, the DNA molecules are aligned and uniformly overstretched (by ~50%) by the receding meniscus (10).

In order to reduce non-specific interactions of QD with the surface during subsequent incubations, the coverslips were incubated for 10 min with blocking reagent (Roche) 1.5 mg/ml in 5 mM MES, pH 5.5, 1 mM EDTA. Coverslips were then washed twice with washing solution (borate 40 mM, pH 8.3). For the digoxigenin labeling scheme, the coverslips were first incubated for 10 min with mouse anti-digoxigenin (Roche) 200 ng/ml in revelation solution (40 mM borate, pH 8.3, 100 mM NaCl and 300 μ g/ml blocking reagent), then washed. The coverslips were then incubated for 10 min with 2 nM QD in revelation solution, using either a QD 605 (number indicates emission wavelength) streptavidin conjugate for biotin labeling, or a QD 655 goat F(ab')₂ anti-mouse IgG conjugate for digoxigenin labeling, or a mix of QD 565 streptavidin conjugate and QD 655 goat F(ab')₂ anti-mouse IgG conjugate (2 nM each) for the dual color labeling scheme. Coverslips were washed five times at the end of the process. The QD were purchased from Quantum Dot Corp. (USA). For each of these steps, the revelation solution (100 μ l) or the washing solution (200 μ l) was pipetted down onto the coverslip and removed by aspiration after the incubation time.

Fluorescence microscopy and image analysis

The coverslips were scanned using an inverted microscope (Olympus IX70) equipped with a 60 \times water-immersion objective (NA = 1.2). The light source was a mercury lamp. After passing through an excitation filter 475AF40, the light was directed onto the sample using a dichroic mirror 505DRLP (Omegafilters). Stained DNA and QD were detected separately with different band-pass filters: 535DF45 for YOYO-1, 540DF27 for QD 565 streptavidin conjugate, 595DF60 for QD 605 streptavidin conjugate and 645DF75 for QD 655 anti-mouse conjugate. Simultaneous observation of DNA

and QD was performed with a 510ALP long-pass filter. Images were captured by a Coolsnap camera (Roper Scientific) and processed with the Metaview software application. Each pixel of the CCD camera chip corresponds to a 215 \times 215 nm square on the sample.

An image of stained DNA was taken in order to localize combed DNA molecules on the surface (exposure time: 1 s). Due to the intermittent fluorescence of QD ('blinking'), a single image of the coverslip was not sufficient to localize all the QD as some of them could be in a dark state during the shot. An important feature of QD is that there is no characteristic blink duration. Therefore, the probability that the QD will emit light during >1 s in a 60 s timeframe is very high (17). We recorded a 60-frame movie (exposure time for each frame: 1 s), which was used to generate two types of processed images. The first is a QD maximum image where each pixel intensity is shown at the maximum intensity displayed in the 60-frame image stack. In the second, the fluorescence signal was averaged. The first image ensures equivalent size for all QD and is used for convenient visualization when overlaying the DNA image and the QD image, as in Figure 2. The second is used for the automated analysis described below.

Images were further analyzed using a program written in MATLAB (MathWorks). In order to localize both QD and DNA, we used a method based on cross-correlation between the fluorescence image and a specific correlation template. The template for QD detection was a two-dimensional isotropic Gaussian function which corresponds to the point spread function of our optical system. This template is justified in that the fluorescent source that we aimed to detect was made of one or a few QD attached to a 0.5 kb DNA fragment. This length corresponds to a maximum distance of 250 nm between two adjacent fluorophores, which is smaller than the optical resolution (~300 nm) of our system. When the QD images were cross-correlated with the QD template, local maxima above a user-fixed signal-to-noise detection threshold were localized. A least-squares Gaussian fit was performed to obtain the localization of the center of the fluorescent spot (18). The DNA detection template was elongated parallel to the combing direction, with a length equivalent to a combed DNA molecule and a Gaussian cross-section. DNA images were also cross-correlated with the DNA template. Local maxima above a user-fixed signal-to-noise detection threshold were localized and associated to the middle of combed DNA molecules. Then, for each maximum, a region-growing algorithm was applied to locate the entire molecule and subsequently its ends. Since DNA molecules may break during the combing process, only combed DNA molecules with apparent lengths ranging from 1.5 to 4.0 μ m were taken into account in further analysis (expected length of a 7.3 kb combed plasmid is ~3 μ m). The labeling was considered to be successful when a QD was localized at <1.0 μ m of a DNA extremity.

RESULTS

Labeling strategy

Our ultimate goal was to label both ends of combed DNA molecules in order to locate these molecules by fluorescence microscopy in the absence of DNA staining agents as well as

to determine their orientation on the coverslips. To do so, two different molecular entities detectable by fluorescence microscopy must be attached to both extremities of the DNA molecule. Specific recognition of DNA extremities can be achieved by ligation of DNA fragments with different cohesive ends. The fluorescent dyes that are used for detection of the modified extremities should be tightly linked to the DNA and produce bright fluorescent signals at two different wavelengths. QD are nanometer-sized, bright fluorescent probes which show exceptional photostability (no bleaching over extended periods of time) and have large excitation and narrow emission spectra, thereby allowing multicolor imaging by using only one excitation wavelength. They are commercially available in a water-soluble form at various emission wavelengths conjugated with biologically active molecules such as streptavidin, biotin and antibodies. Therefore, we chose to incorporate biotin or digoxigenin on both ends of the DNA molecule. We used streptavidin QD for biotin detection and a two layer scheme for digoxigenin detection involving one layer of antidigoxigenin antibodies and one layer of QD coated with a secondary antibody.

Class IIS restriction enzymes, such as BsaI or BsmBI, cleave outside their recognition site and therefore can generate various overhangs. Digestion of the pET11-parC plasmid with BsmBI produced a 6.3 kb fragment with two different cohesive ends (Figure 1). Short fragments of DNA (0.5 kb) with a

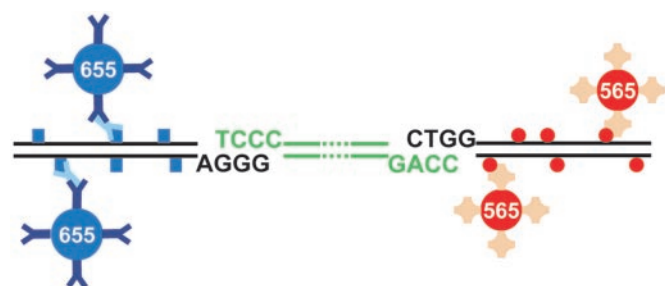


Figure 1. Description of the dual color labeling scheme used in this study. A DNA restriction fragment (shown in green) is ligated to short DNA fragments (shown in black) that are modified with biotin (red circles) or digoxigenin (blue squares), which are revealed using streptavidin QD 565 or one layer of mouse anti-digoxigenin (light blue) followed by anti-mouse QD 655.

cohesive end compatible with one extremity of this restriction fragment were obtained by cleavage of a DNA made by PCR at a BsaI site. This site was introduced close to one extremity by using appropriate primer sequences. The sequences of the overhangs were chosen in order to permit only the hybridizations that lead to the expected construct (Figure 1). Biotin- and digoxigenin-containing fragments were obtained by including biotin-dUTP or digoxigenin-dUTP in the PCR. Our protocol led to incorporation of ~ 75 modified deoxynucleotides in each fragment. Efficient ligation of the gel-purified restriction fragment to one or two 0.5 kb modified DNA fragments, giving DNA molecules of ~ 6.8 or 7.3 kb, was confirmed by gel electrophoresis (data not shown). The yield exceeded 95% for the construct that required two ligations.

Observation of combed DNA molecules by fluorescence microscopy

Modified DNA molecules were then stained with YOYO-1, combed on hydrophobic surface and observed by fluorescence microscopy. Stained DNA molecules are detected by the green fluorescence of the DNA binding dye, while the extremities are detected by red or far red fluorescence of QD. Green images revealed DNA molecules with an apparent length of $\sim 3 \mu\text{m}$ (Figure 2). This is compatible with the length of the combed DNA molecule (6.8 or 7.3 kb). The mean density of DNA molecules was $\sim 10^3/\text{mm}^2$. Because QD blink, red images were acquired every second for one minute and the series was processed as described in the experimental section. Then, the red and green images were superimposed (Figure 2).

We first modified only one end of the DNA molecule by ligating a biotin-containing fragment, using streptavidin QD for revelation. The red images revealed bright monodisperse fluorescent dots, some of which colocalize with the extremities of DNA molecules (Figure 2A). The red dots which did not colocalize with DNA were attributed to non-specific adsorption. Reducing this adsorption was one of the key steps in our experiments. The hydrophobic surface was uniformly covered with QD conjugates after incubation in the absence of treatment (Figure S1, see Supplementary Material). In order to reduce these interactions, coverslips were incubated with a solution of a commercial blocking reagent (Roche) prior to labeling. This reagent, whose principal ingredient is casein, was also added to the solution of QD during incubation.

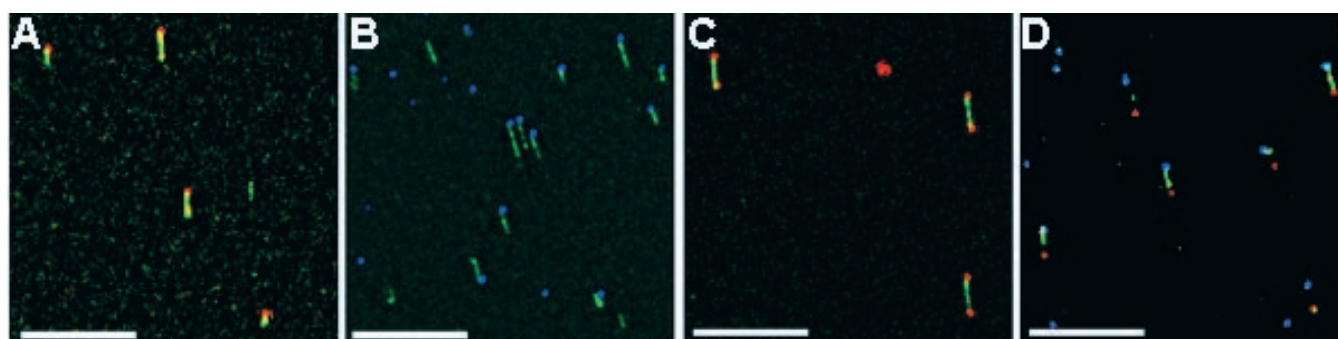


Figure 2. Combed DNA detection with QD. DNA molecules were modified with biotin or digoxigenin at one or both ends, stained with YOYO-1 (green) and combed. Biotin was detected with streptavidin QD 565 (D) or 605 (A and C) (shown in red) and digoxigenin was detected with mouse anti-digoxigenin and anti-mouse QD 655 (shown in blue). Four different labeling schemes were performed: biotin at one end (A), digoxigenin at one end (B), biotin at both ends (C), biotin at one end and digoxigenin at the other end (D). The QD images were processed from a 60 s long image movie (60 images), each pixel intensity is the maximum value of this pixel in the image stack. DNA image and QD maximum were then overlaid. The horizontal bar represents $10 \mu\text{m}$.

With this treatment, the observed density of streptavidin QD was $\sim 3 \times 10^3/\text{mm}^2$. Images were analyzed in order to estimate the efficiency of the labeling procedure using a program created for that purpose (see Material and Methods). About 60% of the DNA molecules displayed a label at one of their extremities (Figure 3, sample A). We noted a preferential orientation of the modified combed DNA. The upper DNA end in Figure 2 is the one that binds to the surface first during the combing process. Ninety percent of the QD signals were located on this end of the DNA molecules, suggesting that the biotin-modified end attaches more frequently to the surface than the non-modified end. To test whether a large number of biotin was required to ensure efficient labeling, we performed the same experiment with a DNA molecule which contains ~ 10 times fewer biotin-modified nucleotides at the extremity. This reduced the labeling efficiency from 60 to 30% (Figure 3, sample A*).

We then performed the same experiment with a digoxigenin-modified DNA molecule (Figure 2B). The molecules were revealed using mouse anti-digoxigenin antibodies and then anti-mouse IgG coated QD. A higher non-specific adsorption was observed with this protocol, and the mean density of anti-mouse QD was $\sim 2 \times 10^4/\text{mm}^2$. This can be attributed to the supplementary incubation step with mouse anti-digoxigenin antibodies, which may non-specifically bind to the surface and therefore lead to additional adsorption of QD. The labeling efficiency was the same as for the biotin-modified DNA (Figure 3, sample B). QD were detected at both ends of the DNA for very few combed molecules (1% of the biotin-modified DNA and 7% of the digoxigenin-modified

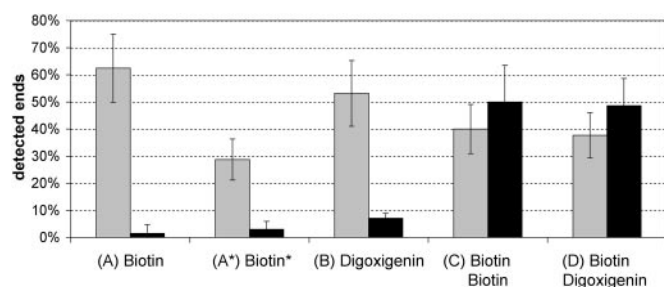


Figure 3. Efficacy of QD DNA detection. DNA was labeled as described in Figure 2, (A*) is a DNA molecule labeled with ten times less biotin than in (A). DNA and QD images were analyzed using a home-made software (see Materials and Methods). The proportion of DNA molecules with one label (gray) or two labels (black) is reported. The error bar is the SD between all fields of view.

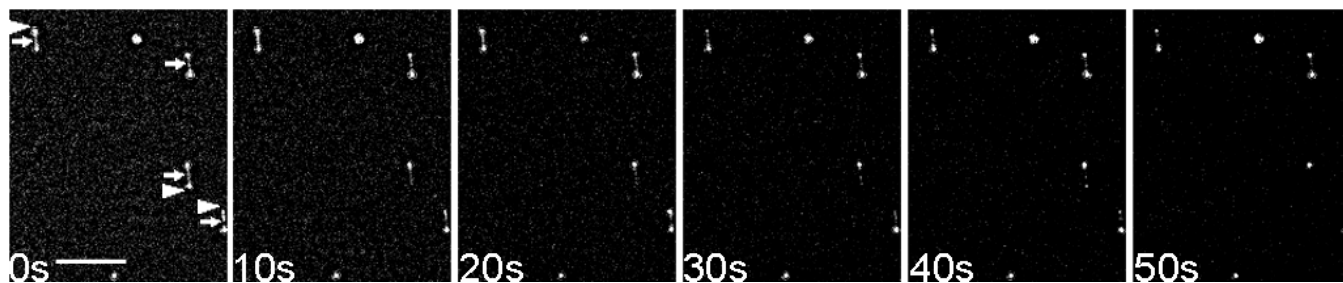


Figure 4. One-minute long observation of labeled DNA. Combed DNA molecules with two biotin-modified extremities were stained with YOYO-1 and visualized using streptavidin QD 605. A 1 min movie was recorded using a long pass filter. Images are shown every 10 s. YOYO-1 stained DNA molecules (arrows) tend to disappear and cannot be visualized after a few tens of seconds. Blinking QD are indicated by triangles. The horizontal bar represents 10 μm .

DNA). This may be due to non-specifically adsorbed QD closer to a DNA end than the chosen localization distance criterion of 1 μm . These values are in agreement with the false-positive detection values expected from the measured QD densities.

We then observed DNA molecules that were modified at both ends, either with biotin alone (Figure 2C) or with biotin at one end and digoxigenin at the other (Figure 2D). In the second case, two different QD conjugates were used at the same time, thereby allowing a 2-color detection scheme. The proportion of molecules with signals at both ends was $\sim 50\%$ in each case. Forty percent of the molecules were labeled at only one end (Figure 3, samples C and D), half of these displayed a QD signal at 565 nm and the other half at 655 nm. We noticed that DNA molecules modified with both biotin and digoxigenin anchored to the surface by the digoxigenin end more than nine times out of ten.

We noted, as expected, that the fluorescence of the DNA staining agent decreased over time when irradiated at 475 nm. Figure 4 shows images taken every 10 s during a 1 min movie of a DNA molecule with two biotin-modified extremities. The use of a long pass filter allowed us to observe the emission of both the DNA staining dye and the QD 605 at the same time. The bleaching of the DNA staining agent as well as the blinking of QD can be clearly observed on these images (see also the movie provided as Supplementary Material, Figure S2).

QD-mediated DNA detection

We then investigated if the QD images could be used to localize the DNA molecules using only their labeled fluorescent extremities. The fluorescent pairs that were separated by $<10 \mu\text{m}$ were selected and their separation length and orientation with respect to the combing direction were recorded and analyzed. For the double-biotin labeling, the distribution of distances showed a peak between 2.5 and 3.0 μm , and the distribution of orientations showed a peak close to 0° (Figure 5A and B). If we restrict the set of molecules to those that have an orientation between -10° and $+10^\circ$, the peak for the distribution of distances can be more clearly distinguished (Figure 5D). Similarly, when the distance between fluorescent pairs is restricted to 1.5–4.0 μm , the orientation distribution peak becomes more apparent (Figure 5C). The biotin–digoxigenin modified samples were submitted to the same analysis. Because of a higher non-specific binding of antimouse-QD to the surface (see above), the histogram background was higher and no peak could be detected in

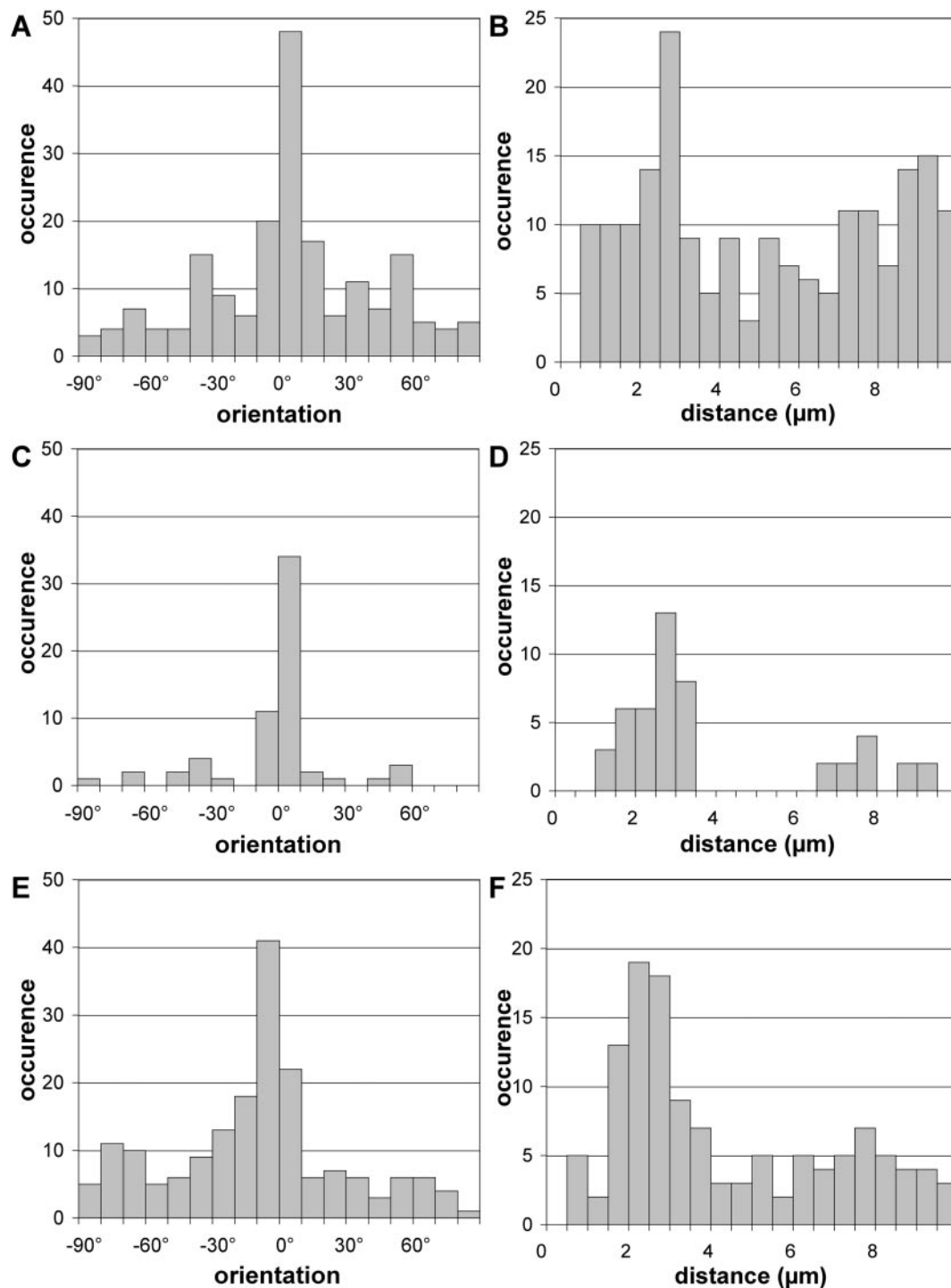


Figure 5. Preferential layout of QD pairs. DNA molecules were modified with biotin at both ends (A–D) or biotin at one end and digoxigenin at the other end (E and F) and combed. Biotin was detected with streptavidin QD 565 or 605 and digoxigenin was detected with mouse anti-digoxigenin and anti-mouse QD 655, respectively. QD images were analyzed using a program written in MATLAB. The angle between a QD pair and the combing direction (A, C and E) and the distance between both QD of the pair (B, D and F) were measured. Results are reported for QD 605 pairs (A, B, C and D) and for pairs involving one QD 565 and one QD 655 (E and F). In C and E, only QD pairs for which the distance is between 1.5 and 4.0 μm are represented. In D and F, only QD pairs for which the angle is between -10° and $+10^\circ$ are represented.

the absence of correlation (data not shown). Nevertheless, when the biotin–digoxigenin data were analyzed in the same manner as the biotin data, the histograms showed peaks corresponding to approximately the same values (Figure 5E and F).

The criteria established above (i.e. a length between 1.5 and 4.0 μm and an angle between -10° and $+10^\circ$) were applied in combination in order to select sets of QD pairs to be analyzed for the presence of DNA. The average distance for these pairs

was $2.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ for the double-biotin detection scheme and of $2.6 \pm 0.6 \mu\text{m}$ for the biotin–digoxigenin scheme. The average orientation was $3 \pm 4^\circ$ for the double-biotin detection scheme and $-1 \pm 5^\circ$ for the biotin–digoxigenin scheme. DNA molecules could be identified by the green emission of YOYO-1 between the two QD in 43 out of 45 cases for the double-biotin labeling (96%), and in 120 out of 165 cases for the biotin–digoxigenin labeling (73%).

We calculated the probability P that a QD pair that satisfies the above-mentioned criteria is actually associated with a DNA molecule. A detected pair can either be two QD at both ends of a DNA molecule or two QD randomly meeting these criteria. P is therefore given by

$$P = \frac{Y \cdot D_{\text{DNA}}}{D_{\text{pairs}} + Y \cdot D_{\text{DNA}}}$$

where Y is the efficiency for labeling a DNA molecule at both ends, D_{DNA} is the density of DNA molecules and D_{pairs} is the density of random QD pairs. When only one type of label is present, for example streptavidin QD, the density D_{pairs} of QD pairs that satisfy specific distance (between r_1 and r_2) and orientation (between a_1 and a_2) criteria by chance is given by

$$D_{\text{pairs}} = \frac{D_b^2}{2} \times \pi(r_2^2 - r_1^2) \times \frac{(a_2 - a_1)}{180}$$

where D_b is the total density of streptavidin QD. The formula changes to

$$D_{\text{pairs}} = D_b \times D_d \times \pi(r_2^2 - r_1^2) \times \frac{(a_2 - a_1)}{180}$$

when two types of different QD were used, where D_d is the total density of anti-mouse QD. D_{pairs} represents here only pairs composed of one streptavidin QD and one antimouse QD. Using our values ($r_1 = 1.5 \mu\text{m}$, $r_2 = 4.0 \mu\text{m}$, $a_1 = -10^\circ$, $a_2 = 10^\circ$, $D_b = 3.10^3/\text{mm}^2$ and $D_d = 2.10^4/\text{mm}^2$), we found D_{pairs} values of 21 and 288 pairs/ mm^2 for the double-biotin and the biotin–digoxigenin scheme, respectively. Taking a value of 50% for Y , as documented by the experiments described above, we can deduce the value of P , which is 96% for the double-biotin labeling scheme and 63% for the biotin–digoxigenin labeling scheme. These values are compatible with the experimental values obtained from our images.

It should be noted that these values depend on both density and length of the DNA molecules, and on the nonspecific adsorption of QD. For example, the value of P for the double-biotin labeling scheme will decrease from 96 to 69% if the length of the DNA is increased by a factor of 8, which corresponds to the length of phage lambda DNA (48.5 kb). The density of DNA we used and the length of these DNA molecules, in combination with the small number of non-specifically bound QD, made for a high probability that QD pairs that satisfy our specific distance and orientation criteria were in reality associated with a DNA molecule. This probability is close to 1 for the biotin labeling scheme and remains over 0.6 for the biotin–digoxigenin labeling scheme, which provides additional information about the orientation of the molecule.

DISCUSSION

The aim of this study was to investigate new labeling strategies for DNA detection by optical microscopy in the absence of any DNA staining agent, in order to facilitate further dynamic studies of DNA–protein interactions at the single molecule level. For this purpose, biotin and/or digoxigenin fragments were ligated to the ends of linear DNA molecules. The modified DNA molecules were then combed on a glass surface and observed by fluorescence microscopy. To the best of our knowledge, this is the first time that the ends of DNA molecules have been detected by fluorescence microscopy using fluorescent QD in a 2-color mode. We have demonstrated that the detection of single DNA molecules is possible by using only the QD images. QD pairs for which distance and orientation were characteristic of labeled DNA molecules can be used as an indicator for the presence of DNA molecules with a low error rate. Image analysis and QD pair selection can be automated using software.

The incorporation of multiple biotin or digoxigenin molecules at each extremity was apparently necessary for efficient detection. These molecules were introduced in the form of modified deoxynucleotides incorporated into short DNA fragments that are produced by PCR and ligated at both ends of the DNA to be studied. The ligation yield exceeds 95%. Non-fluorescent haptens were used instead of fluorescent nucleotides, in order to provide a more versatile approach. Under our experimental conditions, the labeling efficiency for one end was 60% for both labeling strategies, i.e. using biotin and streptavidin QD or digoxigenin, mouse antidigoxigenin and antimouse QD. This efficiency dropped by 50% when the DNA fragment contained ten times less biotin. As QD are likely to always be detected, these yields probably reflect inefficient binding of biotin and digoxigenin by the modified QD. The proximity of the surface might disturb the expected specific interactions, or many biotin or digoxigenin molecules might stick to the surface during the combing process. A preferential attachment of the combed DNA molecules by their modified extremity supports this hypothesis. Moreover, records of single spot fluorescence temporal evolution suggest that only one or very few QD are responsible for the fluorescent signal (see Supplementary Material and Figure S3). The number of modified nucleotides is therefore a critical parameter for efficient labeling to take place.

Organic DNA staining agents interfere with DNA–protein interactions. In addition, these staining agents tend to bleach which leads to DNA cleavage. Moreover, the presence of fluorescence along the entire DNA molecule results in low signal to noise ratio when the emission of other fluorophores is imaged in the vicinity of DNA. We labeled DNA molecules with QD, which display specific optical properties that are not shared by organic fluorophores or fluorescent microspheres and are particularly valuable for single-molecule visualization. For example, they have recently been used to follow the diffusion of glycine receptors in the membrane of neurones (19). They produce localized and long-standing fluorescence signals with sharp emission spectra. QD that have different emission wavelengths can be excited by the same wavelength. It is therefore easy to combine two different wavelengths for DNA extremities and a third for a protein. Our labeling strategy can be used in the presence of physiologically relevant

ionic conditions. Two problems are encountered when one wants to use QD on glass surfaces. The first is that QD blink. This problem was circumvented by acquiring 60 QD images at 1 s intervals. The second is non-specific adsorption onto surfaces. This problem was solved by using an appropriate buffer for the pretreatment of the coverslips as well as during the incubation step. More non-specific adsorption of QD was observed with the anti-mouse QD used for digoxigenin detection. This resulted in a higher probability of erroneous QD-mediated DNA detection. At the date of the experiments, anti-digoxigenin QD conjugate was not yet available. As anti-digoxigenin conjugated QD are currently being commercialized, the protocol could now be simplified and non-specific adsorption would probably be lower.

The development of ultrasensitive instrumentation and new microscopy techniques opens the way to dynamic studies of interacting biomacromolecules by fluorescence microscopy, which will be particularly interesting for DNA studies and its related machinery. The detection scheme presented here will likely be helpful to future investigators. For example, it may be possible to use it in experiments where DNA is elongated by a flow (3), and preliminary experiments suggest that it can be applied to DNA molecules that are attached to a surface by only their extremities (11).

The detection of double-stranded DNA by fluorescence microscopy requires specific labeling strategies. Specific sequences on stretched single DNA molecules have been probed by using fluorescently labeled DNA binding proteins (20,21). We have recently implemented a method of labeling short internal DNA sequences using a triplex forming oligonucleotide ligated to a fragment containing multiple fluorophores (22). In the present paper, QD are used for the detection of biotin or digoxigenin moieties that have been ligated to the ends of DNA molecules. QD have so far been used in only a few studies for detection of nucleic acids. Oligonucleotide probes were conjugated directly to QD or linked to streptavidin-QD upon biotin functionalization, and these conjugates were used for DNA detection in fluorescence in situ hybridization (23,24) or DNA chips (25,26) experiments. In all these cases, the target sequences were present in multiple copies. The detection of short unique sequences of DNA at the single molecule level still represents an experimental challenge. In our approach, the ends of a DNA molecule were detected with a 60% success rate using QD. This efficiency required the incorporation of a large number of biotin or digoxigenin moieties, only a few of which were recognized by QD.

In conclusion, the method we propose for the detection of DNA molecules paves the way towards new dynamic studies of single DNA molecules and their interactions with proteins. QD fluorescent probes appear to be a valuable alternative to the organic dyes that are commonly used to stain DNA. They permit not only long-standing observation by fluorescence microscopy, but also a 2-color determination of the orientation of single DNA molecules. This study also provides useful experimental data regarding the possible use of QD for fluorescence detection of short DNA sequences.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at NAR online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jean-François Allemand for a gift of the plasmid pET11-parC. We also thank Maxime Dahan for his interest in this work, and Heather Sloan for a careful reading of the manuscript. A.C., B.G.L., I.B. and S.B. were supported by grants from Ministère de la Recherche. This work was supported by a grant from Ministère de la Recherche (ACI Nanoscience 2004). Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by INSERM.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Bustamante,C., Bryant,Z. and Smith,S.B. (2003) Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics. *Nature*, **421**, 423–427.
- Strick,T., Allemand,J., Croquette,V. and Bensimon,D. (2000) Twisting and stretching single DNA molecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **74**, 115–140.
- Ladoux,B., Quivy,J.P., Doyle,P., du Roure,O., Almouzni,G. and Viovy,J.L. (2000) Fast kinetics of chromatin assembly revealed by single-molecule videomicroscopy and scanning force microscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 14251–14256.
- Matsuura,S., Komatsu,J., Hirano,K., Yasuda,H., Takashima,K., Katsura,S. and Mizuno,A. (2001) Real-time observation of a single DNA digestion by lambda exonuclease under a fluorescence microscope field. *Nucleic Acids Res.*, **29**, E79.
- Schäfer,B., Gemeinhardt,H., Uhl,V. and Greulich,K.O. (2000) Single molecule DNA restriction analysis in the light microscope. *Single Mol.*, **1**, 33–40.
- Spies,M., Bianco,P.R., Dillingham,M.S., Handa,N., Baskin,R.J. and Kowalczykowski,S.C. (2003) A molecular throttle: the recombination hotspot chi controls DNA translocation by the RecBCD helicase. *Cell*, **114**, 647–654.
- Ha,T., Rasnik,I., Cheng,W., Babcock,H.P., Gauss,G.H., Lohman,T.M. and Chu,S. (2002) Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the *Escherichia coli* Rep helicase. *Nature*, **419**, 638–641.
- Hu,X., Aston,C. and Schwartz,D.C. (1999) Optical mapping of DNA polymerase I action and products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**, 466–473.
- Guéroui,Z., Place,C., Freyssingas,E. and Berge,B. (2002) Observation by fluorescence microscopy of transcription on single combed DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 6005–6010.
- Michalet,X., Ekong,R., Fougereuse,F., Rouseaux,S., Schurra,C., Hornigold,N., van Slegtenhorst,M., Wolfe,J., Povey,S., Beckmann,J.S. and Bensimon,A. (1997) Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science*, **277**, 1518–1523.
- Crut,A., Lasne,D., Allemand,J.F., Dahan,M. and Desbailles,P. (2003) Transverse fluctuations of single DNA molecules attached at both extremities to a surface. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, **67**, 051910.
- Meng,X., Cai,W. and Schwartz,D.C. (1996) Inhibition of restriction endonuclease activity by DNA binding fluorochromes. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **13**, 945–951.
- Liu,Y.Y., Wang,P.Y., Dou,S.X., Wang,W.C., Xie,P., Yin,H.W., Zhang,X.D. and Xi,X.G. (2004) Ionic effect on combing of single DNA molecules and observation of their force-induced melting by fluorescence microscopy. *J. Chem. Phys.*, **121**, 4302–4309.
- Kabata,H., Kurosawa,O., Arai,I., Washizu,M., Margaron,S.A., Glass,R.E. and Shimamoto,N. (1993) Visualization of single molecules of RNA polymerase sliding along DNA. *Science*, **262**, 1561–1563.
- Harada,Y., Funatsu,T., Murakami,K., Nonoyama,Y., Ishihama,A. and Yanagida,T. (1999) Single-molecule imaging of RNA polymerase–DNA interactions in real time. *Biophys. J.*, **76**, 709–715.
- Roulon,T., Hélène,C. and Escudé,C. (2001) A ligand-modulated padlock oligonucleotide for supercoiled plasmids. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 1523–1526.

17. Brokman,X., Hermier,J.-P., Messin,G., Desbiolles,P., Bouchaud,J.-P. and Dahan,M. (2003) Statistical aging and nonergodicity in the fluorescence of single nanocrystals. *Phys. Rev. Lett.*, **90**, 120601.
18. Bonneau,S., Cohen,L. and Dahan,M. (2004) Multiple target approach for single quantum dot tracking. *2004 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*. Arlington, VA, pp. 664–667.
19. Dahan,M., Levi,S., Luccardini,C., Rostaing,P., Riveau,B. and Triller,A. (2003) Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science*, **302**, 442–445.
20. Oana,H., Ueda,M. and Washizu,M. (1999) Visualization of a specific sequence on a single large DNA molecule using fluorescence microscopy based on a new DNA-stretching method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **265**, 140–143.
21. Taylor,J.R., Fang,M.M. and Nie,S. (2000) Probing specific sequences on single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles. *Anal. Chem.*, **72**, 1979–1986.
22. Géron-Landre,B., Roulon,T., Desbiolles,P. and Escudé,C. (2003) Sequence-specific fluorescent labeling of double-stranded DNA observed at the single molecule level. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e125.
23. Pathak,S., Choi,S.K., Arnheim,N. and Thompson,M.E. (2001) Hydroxylated quantum dots as luminescent probes for *in situ* hybridization. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 4103–4104.
24. Xiao,Y. and Barker,P.E. (2004) Semiconductor nanocrystal probes for human metaphase chromosomes. *Nucleic Acids Res.*, **32**, e28.
25. Robelek,R., Niu,L., Schmid,E.L. and Knoll,W. (2004) Multiplexed hybridization detection of quantum dot-conjugated DNA sequences using surface plasmon enhanced fluorescence microscopy and spectrometry. *Anal. Chem.*, **76**, 6160–6165.
26. Gerion,D., Chen,F., Kannan,B., Fu,A., Parak,W.J., Chen,D.J., Majumdar,A. and Alivisatos,A.P. (2003) Room-temperature single-nucleotide polymorphism and multiallele DNA detection using fluorescent nanocrystals and microarrays. *Anal. Chem.*, **75**, 4766–4772.

3.4 Détection de courte séquence d'ADN à l'aide de triple hélices

Ces travaux ont été l'objet de notre première collaboration avec C. Escudé. L'idée générale était de détecter une très courte séquence d'ADN double-brin (15 bp) à l'échelle de la molécule individuelle. Nous avons pour cela utilisé des triples hélices (Triplex Forming Oligonucléotides-TFO) attachées des fragments d'ADN dans lequel étaient incorporés des fluorophores (Alexa 546). L'ADN a été peigné sur des surfaces couvertes de polystyrène, et les triples hélices détectées par microscopie de fluorescence. Il existe très peu de méthodes permettant de détecter des séquences spécifiques courtes sur de l'ADN double-brin. Citons par exemple l'utilisation de protéines fluorescentes spécifiques de séquences, visualisées sur de l'ADN λ peigné [102, 103]. Des acides nucléiques peptidiques (Peptide Nucleic Acid -PNA) [104] ou des TFO fluorescents [105] ont également été utilisés, ainsi que des ligands du petit sillon de l'ADN [106], pour effectuer un marquage *in situ* de l'ADN sans dénaturation. Dans tous ces cas cependant, de nombreuses copies de la séquence-cible étaient présentes sur l'ADN. Par contraste, notre méthode permet de marquer de manière très spécifique une seule séquence courte de l'ADN.

Stratégie de marquage de l'ADN

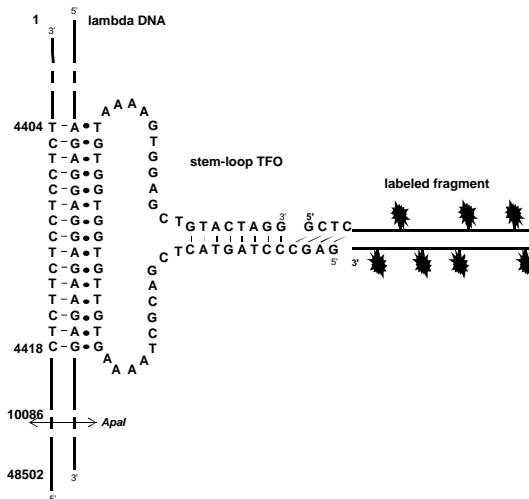


FIG. 15 – Description de la stratégie de marquage. La séquence de l'oligonucléotide utilisé permet de former une triple hélice avec la séquence cible, située entre les bases 4404 et 4418 du phage. Un fragment PCR dans lequel des nucléotides fluorescents ont été incorporés est digéré afin de produire une extrémité ensuite liguée à l'extrémité 5' du TFO.

Nous avons utilisé de l'ADN du phage λ , qui contient une séquence oligopurine-oligopyrimidine située à 4404 bp de l'extrémité la plus proche. Un TFO de 59 bp a été construit tel que sa partie centrale peut former une triple hélice avec la séquence du phage (figure 15). Ses extrémités sont de plus complémentaires, de sorte que le TFO peut s'hybrider pour former une tige de huit bp à l'extrémité 5' de laquelle subsistent quatre nucléotides accessibles. Un fragment PCR de longueur 500 bp, dans lequel ont été incorporés des nucléotides fluorescents (Alexa 546) peut être attaché au TFO, formant une sonde fluorescente pour la séquence cible. Chaque fragment contient environ 20 fluorophores. Les protocoles sont détaillés dans l'article joint en annexe [101].

Résultats

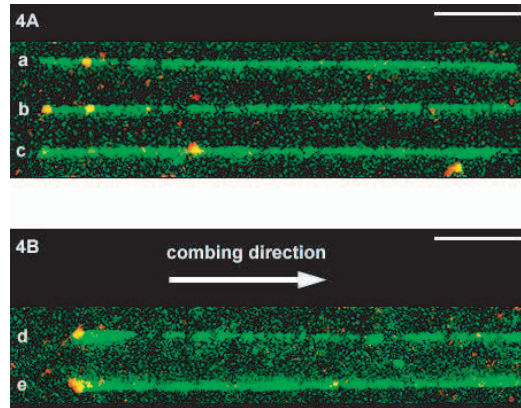


FIG. 16 – Visualisation des TFO fluorescents sur de l'ADN peigné. L'ADN, teinté au YOYO1, apparaît en vert. Les fragments obtenus par PCR contiennent des nucléotides fluorescents (Alexa546, rouge). Ils apparaissent comme des spots jaunes. La barre représente 5 μm . Montage réunissant les différents cas rencontrés de peignage et de marquage : (A) molécules peignées les plus longues (26-27,5 μm). Les molécules ont été alignées afin que les séquences cibles soient situées à gauche, alors qu'elles étaient également distribuées sur gauche et sur la droite de l'ADN après peignage. (B) molécules peignées les plus courtes (23,5-25,5 μm). Dans ce cas, les molécules d'ADN sont systématiquement attachées par le fragment fluorescent, avant d'être peignées dans la direction indiquée par la flèche.

Après peignage sur lamelles couvertes de polystyrène, l'ADN teinté au YOYO1 est détecté par microscopie de fluorescence, ainsi que les fragments contenant Alexa546, et les images obtenues sont superposées (figure 16). Environ un tiers des molécules peignées possède la longueur attendue pour de l'ADN λ (26,7 \pm 0,4 μm), le reste des molécules étant plus courtes (24,3 \pm 0,5 μm). Sur les 38 molécules appartenant au premier groupe, 22 molécules (58 %) présente un spot rouge à 2,3 \pm 0,3 μm d'une extrémité. Cette position correspond à la position de la séquence cible, située à 4404 bp (soit 2,4 μm) de l'extrémité de la molécule du phage λ peigné (48 502 bp, soit 26,7 μm). L'efficacité de couplage (environ 60 %) est comparable à celle observée lors d'expériences antérieures dans le groupe de C. Escudé. Le second groupe de molécules peignées comptait 69 molécules, dont 57 (84 %) contenait un fragment fluorescent à l'extrémité de l'ADN qui s'était attaché à la surface avant peignage. Il semble donc que les interactions non-spécifiques entre le TFO et la surface puissent servir à l'ancrage de l'ADN avant peignage. Cette assertion est étayée par le fait que la différence de taille entre les deux groupes de molécules (26,7-24,3 μm) correspond à la distance entre la cible et l'extrémité de l'ADN (2,3 μm). Le second groupe de molécules correspond donc à des molécules correctement marquées, mais qui se sont accrochées par leur sonde à la surface avant peignage (figure 16).

La détection de séquences courtes sur l'ADN n'est sans doute pas la seule application de cette technique. Nous verrons en conclusion de ce mémoire que nous envisageons d'utiliser les TFO fluorescents, éventuellement marqués à l'aide de NCs, pour étudier la dynamique d'enzymes se déplaçant le long de l'ADN. Ces TFO peuvent en effet glisser le long de l'ADN et, poussés par une polymérase, pourraient en éclairer la dynamique sans que l'enzyme soit marquée.

Sequence-specific fluorescent labeling of double-stranded DNA observed at the single molecule level

Bénédicte Géron-Landre, Thibaut Roulon, Pierre Desbiolles¹ and Christophe Escudé*

Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle, INSERM U565, CNRS UMR8646, 43, rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France and ¹Laboratoire Kastler Brossel, Ecole Normale Supérieure, 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France

Received July 21, 2003; Revised and Accepted August 28, 2003

ABSTRACT

Fluorescent labeling of a short sequence of double-stranded DNA (dsDNA) was achieved by ligating a labeled dsDNA fragment to a stem-loop triplex forming oligonucleotide (TFO). After the TFO has wound around the target sequence by ligand-induced triple helix formation, its extremities hybridize to each other, leaving a dangling single-stranded sequence, which is then ligated to a fluorescent dsDNA fragment using T4 DNA ligase. A non-repeated 15 bp sequence present on lambda DNA was labeled and visualized by fluorescence microscopy after DNA combing. The label was found to be attached at a specific position located at 4.2 ± 0.5 kb from one end of the molecule, in agreement with the location of the target sequence for triple helix formation (4.4 kb from one end). In addition, an alternative combing process was noticed in which a DNA molecule becomes attached to the combing slide from the label rather than from one of its ends. The method described herein provides a new tool for the detection of very short sequences of dsDNA and offers various perspectives in the micromanipulation of single DNA molecules.

INTRODUCTION

Recent advances in ultrasensitive instrumentation have contributed to the development of single molecule studies, which have provided important information that complements conventional biochemical approaches regarding the kinetic and mechanical aspects of biomolecular interactions. In the field of DNA structure and protein interactions, these studies have shown the existence of new structural motifs (1) and shed new light into the mechanism of DNA processing enzymes. The effects on DNA of mechanical constraints (2) or protein interactions (3–8) can be observed by single molecule manipulation techniques combined with force measurements,

but DNA molecules can also be visualized directly using electron, atomic force or optical microscopy (8–11). Different methods have been used for the observation of single DNA molecules by optical microscopy. For example, DNA elongated by a laminar flow or an electric field and stained with the dye YOYO has been used for the study of chromatin assembly (12) or exonuclease activity (13), respectively. One particularly interesting technique for stretching DNA in a homogeneous and reproducible manner is DNA combing (14,15). This method has been extensively used for the physical mapping of genomes by *in situ* hybridization (16) and it has been extended recently to the study of DNA–protein interactions. It has been possible for example to observe an enzymatic process such as RNA polymerization on combed DNA molecules (17).

Various methods have been described for the sequence-specific recognition of dsDNA. Oligopurine-oligopyrimidine sequences can be targeted by Peptide Nucleic Acids (PNA) (18) or Triplex Forming Oligonucleotides (TFO) (19). Recognition involves strand displacement followed by triplex formation on one DNA strand in the former case or direct recognition of the DNA major groove in the latter. Polyamides composed of *N*-methyl-3-hydroxypyrrrole, *N*-methylpyrrole and *N*-methylimidazole can specifically target any short sequence of dsDNA by binding in the minor groove (20). A sequence-specific label can also be introduced by circularizing an oligonucleotide around a single-stranded target after local opening of the DNA double helix using so-called PNA-openers (21), or after heat denaturation of AT-rich sequences within supercoiled DNA (22). We have also recently reported a method by which TFOs can be circularized around specific double-stranded DNA sequences (23,24). Most of these strategies can be used for the observation of sequence-specific labeled dsDNA by electron and atomic force microscopy (21,22,24–27).

Very few methods have been described for the detection of double-stranded DNA sequences by optical microscopy. Fluorescently labeled sequence-specific DNA binding proteins have been visualized on stretched lambda DNA (28,29). Fluorescently labeled PNAs (30), TFOs (31), as well

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 1 40793774; Fax: +33 1 40793705; Email: escude@mnhn.fr

Present address:

Thibaut Roulon, ANOSYS Inc., 1014 Hamilton Court, Menlo Park, CA 94025, USA

This paper is dedicated to the memory of Professor Claude Hélène. We are grateful to him for initiating this project, for sharing with us his numerous ideas and for transmitting his passion for research in the field of nucleic acids.

as minor groove binding agents (32) have been used for *in situ* labeling without denaturation, but in all cases the targeted sequences were present in multiple copies, as it occurs in centromeric and telomeric repeats. Here, we describe a novel method for linking a highly fluorescent probe to double-stranded DNA in a sequence-specific way. This probe has been used for detecting a short target sequence on combed lambda DNA by optical microscopy.

MATERIALS AND METHODS

Oligonucleotides and chemicals

The sequence of the 59mer stem-loop TFO and 39mer linear TFO were 5'GAGCCCTAGTACTCGACGCTAAAAGTG-TTGTGGTGGTGTAAAAGTGGAGCTGTACTAGG3' and 5'GAGCCCTAGTACTCGACGCTAAAAGTGGTGTGGT-GGTGT3', respectively. An 8mer adapter 5'GTACTAGG3' was used with the 39mer linear TFO. The sequences of the primers used for PCR were 5'CGTTGGTCTCTGCTCGG-TATCAGCTCACTCAAAG3' (fw), and 5'GGCGATAAGT-CGTGTCTTAC3' (rv). The fw primer was biotinylated at the 5' end during synthesis. All these oligonucleotides were obtained from Eurogentec (Seraing, Belgium); their concentration was calculated using a nearest-neighbor model for absorption coefficients.

The TFO was 5'-phosphorylated for the ligation reactions using the following protocol: 300 pmol of oligonucleotide were incubated in 50 µl of T4 DNA ligase buffer [50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP and 25 µg/ml BSA, pH 7.8 at 25°C, New England Biolabs (NEB)] with 10 U T4 PNK (NEB), for 1 h 30 min at 37°C.

Synthesis of the triplex stabilizing agent BQQ (6-[3-(dimethylamino)propyl]amino-11-methoxy-benzo[f]quinoxaline) has been described previously (33).

Preparation of lambda DNA

Lambda DNA was purchased from Amersham. In order to avoid concatemerization during the ligation reactions, the single-stranded ends were partially filled; 25 µg of lambda DNA were incubated in 100 µl of Eco buffer (NEB) supplemented with 50 µM of dATP, 50 µM of dGTP and 5 U of Klenow fragment (NEB) for 3 h at 37°C. The polymerase was then inactivated by heating for 20 min at 75°C and the DNA was ethanol precipitated. This resulted in lambda molecules with 9 base overhangs that cannot be ligated to each other.

Preparation of DNA fragments

PCR primers were designed in order to produce a fragment of approximately 500 bp starting from the pBluescript SK+ plasmid (Stratagene). The sequence of the fw primer was chosen in order to introduce a cleavage site for the BsaI restriction enzyme. The PCR reaction was carried out by mixing each primer (1.6 µM) in *Taq* buffer (Promega) with 2 mM MgCl₂, 50 µM of each of dATP, dCTP and dGTP, 33 µM of dTTP, 17 µM of dUTP-Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), 10 pg/µl of pBluescript and 0.1 U/µl of *Taq* polymerase (Promega). After 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 61°C and 1 min at 72°C (this last time increasing by 10 s per cycle), the concluding extension was carried out for 10 min at

72°C. Usually, 900 µl of PCR mix was prepared and aliquotted into eighteen 50 µl tubes. Primers and unincorporated dNTP were removed using Qiagen PCR purification kits, using the standard protocol. Then the PCR products were digested overnight at 50°C with 100 U BsaI (NEB) in a total volume of 200 µl. The biotinylated extremities and the non-digested biotinylated PCR products were removed using streptavidin-coated magnetic beads (Dynabeads). The labeled fragments were then ethanol precipitated and quantified by absorption spectroscopy. Absorbance maxima were measured near 260 nm and near 553 nm. The extinction factor and the correction factor (absorbance ratio A_{260}/A_{553} for the free Alexa Fluor 546 dye) indicated by the provider allowed us to estimate the concentration of the fragments and the amount of dye per fragment. Unlabeled fragments were prepared in the same way except that the PCR was carried out using 200 µM of each unmodified dNTP and the elongation step was maintained at 1 min at 72°C for all the cycles.

For some experiments, the DNA fragments had to be ligated to the linear or stem-loop TFOs before any contact with lambda DNA. For this purpose, 100 nM of the fragment was mixed with 200 nM of the stem-loop TFO or with 200 nM of the linear TFO and 400 nM of the 8mer adapter in 50 µl of T4 DNA ligase buffer (NEB), heated to 65°C and slowly cooled to room temperature. 400 U of T4 DNA ligase (NEB) were added and the sample was incubated overnight at 20°C. The fragments were purified from the excess oligonucleotides using a Qiagen PCR purification kit.

Attachment of DNA fragments to the target site

Lambda DNA (1 µg; 3 nM) was incubated in 10 µl of T4 DNA ligase buffer with 20 µM of the triplex stabilizing ligand BQQ, 100 nM of TFO and 200 nM of labeled fragment (for fluorescence microscopy analysis) or unlabeled fragment (for gel retardation assay). The sample was heated to 80°C and slowly cooled to room temperature. 400 U of T4 DNA ligase were then added and the sample was incubated overnight at 20°C.

When removal of the fragment was necessary, the previously described spermidine precipitation procedure was used (34). Briefly, 10 µl of the ligation reaction were diluted to a final volume of 100 µl in a precipitation buffer containing 20 mM Tris pH 8.0, 40 mM NaCl, 8 mM MgCl₂ and 12.5 mM of ice-cold spermidine. The sample was incubated for 30 min at room temperature and centrifuged for 15 min at 14 000 r.p.m. The pellet was rinsed with 100 µl of a 1:1 v/v mix of isopropanol and a solution containing 600 mM NaCl, 20 mM MgCl₂ and 50 mM EDTA. It was resuspended in 100 µl of T4 DNA ligase buffer supplemented with 4 µM BQQ and 150 nM YOYO-1 (Molecular Probes).

Then 50 ng of YOYO stained DNA were loaded on a 1% agarose gel in 0.5× TBE buffer at 14°C. The migration conditions were 6 V/cm, 120°, 1 to 6 s pulses, for 20 h in a Chef DRIII pulsed-field gel electrophoresis system (Bio-Rad). The gel was then stained with ethidium bromide.

Attachment site analysis

The specificity of the labeling reaction was checked by digesting lambda DNA with the ApaI restriction enzyme. After the ligation reaction, the sample was heated for 20 min at 65°C to inactivate the ligase. 200 ng of lambda DNA (2 µl of

the ligation reaction) were incubated with 5 U of *Apal* (Promega) in 20 μ l of the recommended buffer (10 mM Bis Tris Propane-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol pH 7.0 at 25°C) for 3 h at 37°C. The digested sample was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis as described above except that the migration time was 12 h.

Molecular combing

Glass surfaces were rendered hydrophobic by polystyrene spin-coating: a drop of polystyrene (5% w/v in toluene) was placed on a clean coverslip and spread by spin-coating at 3000 r.p.m. for 20 s. Then 50 ng of DNA stained with YOYO-1 (at a ratio of 1 dye for 100 bp) was added in a reservoir containing 3 ml of MES 50 mM, pH 5.5 at 4°C. The coverslip was dipped into the reservoir for 2 min and then slowly and regularly pulled up with a Combing Apparatus (Institut Pasteur).

The proposed mechanism of molecular combing (35) suggests that, at an appropriate pH, DNA in the reservoir binds to the coverslip's surface mainly by one of its extremities. When the coverslip is pulled up, the DNA molecules are aligned and uniformly overstretched by the receding meniscus like 'algae by the receding tide' (35).

Images

The coverslips were scanned using an Olympus inverted microscope equipped with a 100 \times , 1.4 numerical aperture oil immersion objective lens, in combination with an Hg lamp and filter sets chosen for the detection of YOYO-1 and AlexaFluor 546 (OmegaFilters). Pictures were recorded with a CCD camera (CoolSnap, Roper Scientific) (exposure time 100 ms). The length of the DNA molecules and the position of the labels were analyzed with MetaVue (Roper Scientific) and ImageJ software.

RESULTS

Strategy for labeling double-stranded DNA

Triple helix forming oligonucleotides bind to dsDNA in a very sequence-specific way. In order to achieve fluorescent labeling of dsDNA, several fluorophores should be attached to a TFO that is stably bound to its target sequence. We have recently described a method for attaching peptides to dsDNA in which a stem-loop TFO is ligated to a peptide-conjugated hairpin oligonucleotide (36). In a similar approach, the short hairpin oligonucleotide may be replaced by a longer double-stranded DNA fragment in which several fluorescent compounds could be incorporated (Fig. 1).

A lambda DNA molecule was chosen as the dsDNA to be labeled. A 15 bp oligopurineoligopyrimidine target sequence, located 4404 bp from the closest end of the molecule was selected, and a 59mer stem-loop oligonucleotide was designed with a central part capable of forming a triple helix by binding to this sequence. This triple helix is made of T.AxT and C.GxG base-triplets and is very stable in the presence of the triplex stabilizing agent BQQ (34). Complementary sequences were introduced in the 3'- and 5'-regions of the TFO so that they can hybridize to each other, forming a 8 bp double-stranded stem with a 4 nucleotide dangling 5' end (Fig. 1).

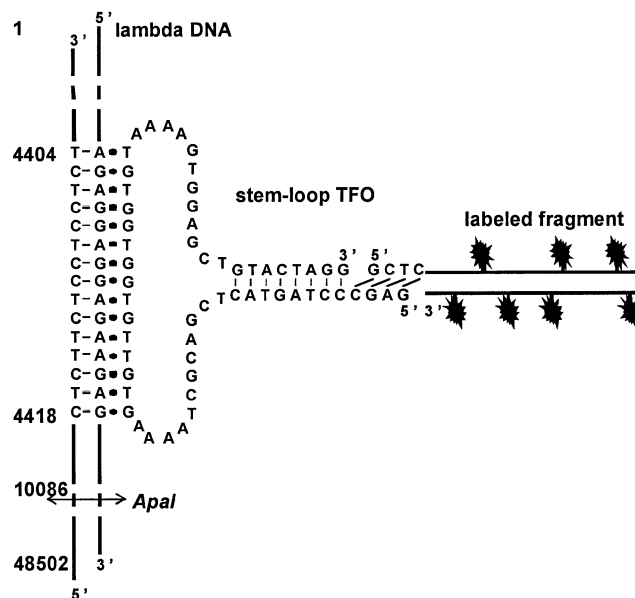


Figure 1. Description of the labeling strategy used in this study. The sequence of the 59mer stem-loop TFO is shown. The 59mer oligonucleotide can form a triple helix by binding to a 15 bp oligopurineoligopyrimidine target sequence, located between 4404 and 4418 bp from the extremity of the phage. A fluorescently labeled fragment made by PCR is digested by a class IIS restriction enzyme in order to produce a sticky end that can be ligated to the 5'-end of the TFO. The restriction site for *Apal* is indicated.

The labeled fragment of approximately 500 bp was produced by PCR using pBluescript as a template. A site for the class IIS restriction enzyme *BsaI*, which enables it to produce any 4 base overhang after digestion, was introduced close to one end of the fragment in order to obtain a sticky end complementary to the 5' end of the oligonucleotide. A non-self-complementary sequence was chosen in order to avoid self ligation of the oligonucleotide or the fragment.

A fluorophore-coupled dUTP was incorporated during the PCR reaction. Several conditions and several fluorophore-modified dUTP were tried for preparation of the labeled fragment, and for each of them the quantity of final product as well as the number of fluorophores that have been incorporated have been measured by absorption spectroscopy. dUTP carrying AlexaFluor 546 was found to be incorporated efficiently. The conditions we used (see Materials and Methods) resulted in the reproducible incorporation of at least 20 fluorophores in the 500 bp fragment with an acceptable decrease of the PCR reaction yield. The quantity of PCR product per tube was indeed 30% of that obtained under standard conditions with unmodified dNTPs.

Attachment of the DNA fragment to the specific target

We checked first whether the DNA fragment could be linked to its target site. To prevent auto-ligation of the complementary ends of the lambda molecules during the ligation reaction, the 12 nucleotide single-stranded ends of the lambda molecules were partially filled using a bacterial DNA polymerase (Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase). The TFO, the DNA fragment (unlabeled) and lambda DNA were mixed in the presence of the triplex-specific ligand BQQ in T4 DNA ligase buffer. The samples

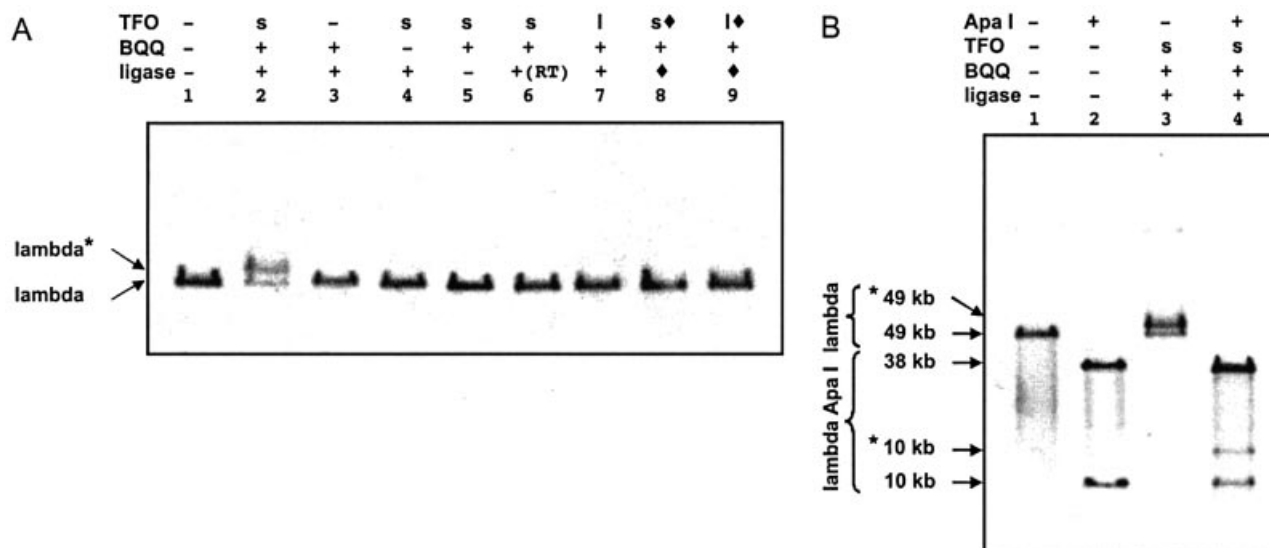


Figure 2. Attachment of the labeled fragment to its specific target site as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. (A) Lambda DNA (previously treated in order to prevent concatemerization) was incubated with the stem-loop (s) or the linear (l) TFO and the DNA fragment in the presence of BQQ and the enzymatic ligation reaction was performed. The TFO was omitted in lanes 1 and 3. BQQ was omitted in lanes 1 and 4. The ligase was omitted in lanes 1 and 5. Sample shown in lane 6 was not heated before ligation. In lanes 8 and 9, the stem-loop (s, filled lozenge) or linear (l, filled lozenge) TFO had been ligated (filled lozenge) to the labeled fragment before performing the incubation with lambda DNA. (B) Lambda DNA loaded on lanes 1 and 3 was identical to that of lanes 1 and 2 in (A), respectively. These unlabeled and labeled phage molecules were digested with *ApaI* (lanes 2 and 4), which generates a 38 kb and a 10 kb fragment. Bands *49 kb and *10 kb correspond to the shifted (labeled) 49 kb lambda DNA and 10 kb fragment, respectively.

were heated to 80°C to permit the opening of the TFO stem-loop structure, and then slowly cooled down to allow first triple helix formation followed by hybridization of the ends of the TFO to each other. T4 DNA ligase was then added and the mixture was incubated overnight at 20°C in order to ligate the TFO to the fragment's sticky end.

The formation of the labeling complex was assessed by a gel shift assay as the labeled lambda molecules migrate more slowly than the unlabeled molecules when analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (Fig. 2A, lane 2). The observed shift was probably larger than what would be expected upon addition of 500 bp to a lambda molecule. This may be due to the branched structure of the labeled lambda molecule. This assay allowed us to measure a yield for the labeling reaction between 50 and 60%. No shift was observed in the absence of TFO (lane 3), BQQ (lane 4), or ligase (lane 5), or when the samples were not heated before addition of ligase (lane 6). This suggests that attachment of the fragment necessitates ligand-induced triple helix formation and opening of the stem-loop structure, although the heating step may in fact be required only for the purpose of annealing.

We wondered whether the TFO was wound around the target sequence. First, we ligated the DNA fragment to the stem-loop TFO before the formation of a complex with lambda DNA. No band shift was observed (lane 8). The ligation prevents the opening of the TFO stem-loop structure, and it is unlikely that the TFO would thread along lambda DNA to reach its target sequence. Then, a 39mer linear TFO was designed based on the 59mer stem-loop TFO, which lacks the 3'-side of the triplex-forming sequence. This oligonucleotide can be ligated to the DNA fragment upon addition of a short adapter oligonucleotide whose sequence corresponds to the eight nucleotides on the 3'-end of the 59mer. No shift was

observed when this linear TFO was used, whether the ligation was performed before (lane 9) or after (lane 7) triple helix formation. These results show that the only complex that can be detected in the gel shift assay is the one where the TFO can wind around its target sequence.

To check whether the DNA fragment was attached on the right target sequence, we digested the labeled lambda DNA with an enzyme that yields a 10 kb DNA molecule containing the target site and a 38 kb DNA molecule. Analysis of the samples by pulsed-field gel electrophoresis showed that only the lower band, i.e. the 10 kb molecule, was shifted (Fig. 2B, lane 4), thus indicating that the DNA fragment was attached to the 10 kb segment, which contains the target sequence and not to the longer 38 kb segment. No shift was observed in control experiments when the labeling complex had not been formed (Fig. 2B, lane 2). All these results suggest that the DNA fragment can be attached in a sequence-specific way to a target site on lambda DNA.

Visualization of the fluorescent label on combed DNA

Fluorescence microscopy was then used to observe the labeled fragment attached to combed lambda DNA molecules. Since labeled fragments may bind to the combing surface, the large excess of fragments that are not ligated to phage molecules had to be removed. This was achieved by spermidine selective precipitation. More than 95% of the labeled fragments were removed while more than 95% of the lambda DNA were preserved, as assessed by agarose gel electrophoresis (not shown). The purified lambda DNA was then stained with YOYO-1 and combed on a polystyrene coated slide. Images were acquired separately for each fluorophore (YOYO-1 and Alexa Fluor 546) and then superimposed. The green images showed the elongated YOYO-1 stained lambda DNA

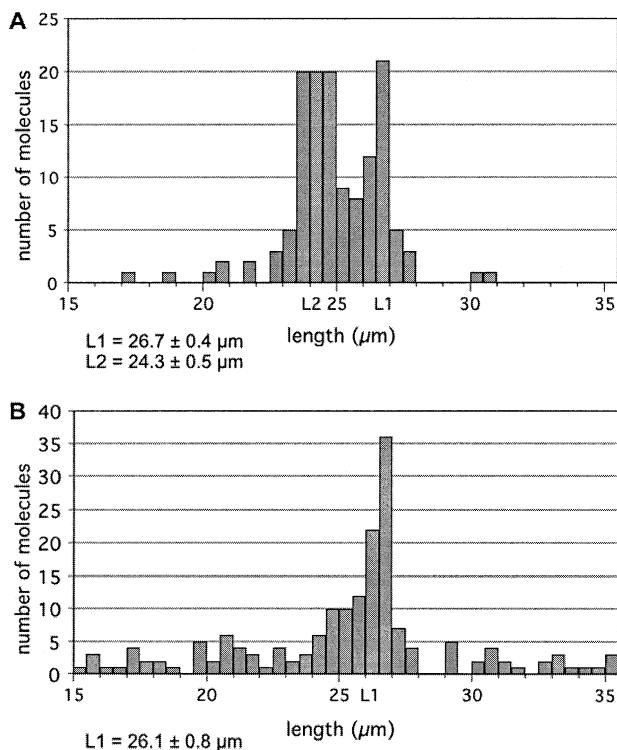


Figure 3. Analysis of the length of combed lambda DNA molecules. Lambda DNA molecules either labeled (A) or untreated (B) were combed on polystyrene coated slides. Images were captured and analysed. 135 (A) and 159 (B) molecules were measured.

molecules, as usually observed after the combing process, and bright monodisperse fluorescent dots spread over the slide. The red images also revealed bright monodisperse fluorescent dots which colocalize with the green ones, giving yellow dots on the superimposed images (Fig. 4). The red signal showed low bleaching and a signal/noise ratio of 4. The size of the spots (300 nm) is diffraction limited. Therefore, each spot may correspond to any combed DNA molecule with a length below 700 bp. These observations suggest that these dots represent single DNA label molecules that have incorporated several Alexa Fluor 546 and are also stained with YOYO-1. In each field of view ($100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$), an average of 12 lambda DNA molecules and 80 fluorescent dots were usually observed. Thus the probability to observe a label on a lambda molecule only by chance was low and the probability to observe it at the expected position was very low.

We first measured the size of the combed molecules in order to control their integrity. Few short molecules were observed, which probably resulted from phage molecules that have been broken during the combing process; the very few molecules with a length below $15 \mu\text{m}$ were not analyzed. Very long molecules were not observed as the sample had been previously treated to prevent lambda concatemerization. Surprisingly two sets of molecules could be distinguished among the $15\text{--}30 \mu\text{m}$ analyzed molecules: about one-third of the molecules were $26.7 \pm 0.4 \mu\text{m}$ long, while the other two-thirds were $24.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ long (Fig. 3A). In a control experiment where lambda molecules were combed without any pretreatment, the same analysis showed only one set of

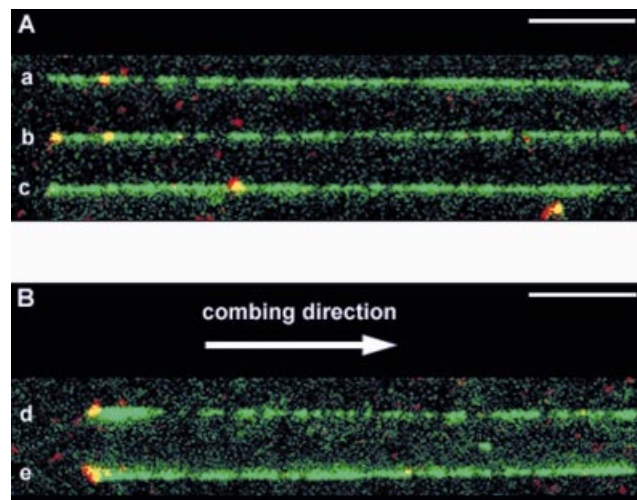


Figure 4. Visualisation of labels on combed lambda molecules. DNA was stained with YOYO-1 (green). The labeled DNA fragments contained Alexa Fluor 546 (red); they therefore appear as yellow spots. The bars represent 5 μm . A montage of different patterns of combing and labeling is produced: (A) aligned longer ($26\text{--}27.5 \mu\text{m}$) molecules. The combed molecules were aligned so that the red internal labels were located on the left side, but they were equally distributed on both sides with respect to the combing direction (see text). (B) Aligned shorter molecules ($23.5\text{--}25.5 \mu\text{m}$). In this case, combed molecules were oriented with respect to the combing direction, i.e. the left side is the side where the DNA molecule sticks first to the glass surface, before being stretched in the direction indicated by the arrow.

full-length molecules ($26.1 \pm 0.8 \mu\text{m}$) (Fig. 3B); the length distribution for the labeled molecules is significantly different from that observed for the non-labeled molecules ($P < 0.001$).

The two sets of molecules were further analyzed separately for the position of red labels with respect to entire lambda molecules. The first set consisted of 38 molecules with a length between 26.0 and $27.5 \mu\text{m}$. Within this set, 22 molecules (58%) exhibited a red label at $2.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$ from the nearest extremity (Figs 4A, a, b and 5A). This position corresponds to the location of the target sequence, at 4404 bp ($2.4 \mu\text{m}$) from the extremity of the 48 502 bp fully extended ($26.7 \mu\text{m}$) lambda molecule. The labeling yield (58%) appeared to be in good agreement with the results of gel-shift experiments (labeling yield between 50 and 60%). No distinctive orientation of the lambda molecules could be noted: the label was equally distributed on both sides of the combed molecule with respect to the combing direction (Fig. 5A, left). Four molecules (11%) were observed with a label at a different position from the expected one (Fig. 4A, c). It is not obvious whether these labeled fragments were attached to the lambda molecules at a non-specific site or whether they were not removed during the purification process and became attached to the slide close to a lambda molecule. Eleven molecules (29%) were observed with a label at their extremity (Fig. 4A, b), nine of which were on the same side relative to the combing direction, i.e. on the side that sticks first to the glass surface. This suggests that there could be some non-specific interactions during the combing process between this extremity and the labeled fragment, or that labeled fragments could be ligated at the end of lambda molecules and then favor attachment to the slide during the combing process.

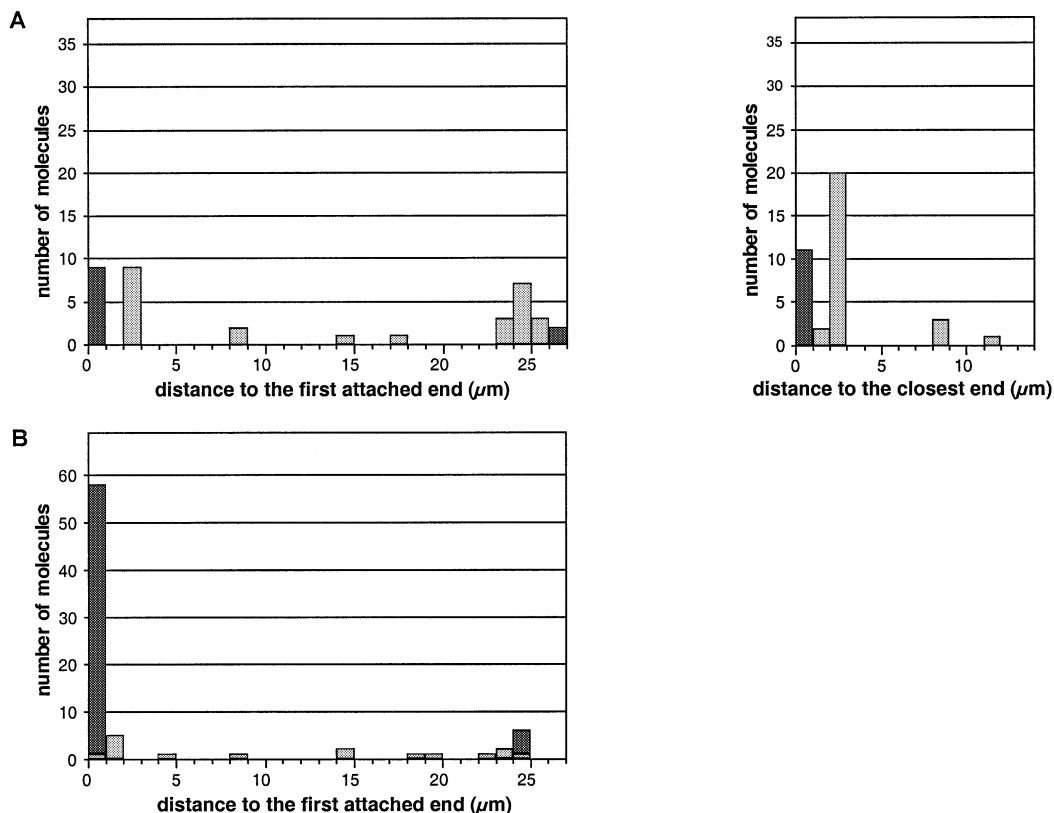


Figure 5. Histograms presenting the position of labels on lambda DNA molecules. Distances were measured between the label and the end of the molecule that becomes attached first to the slide during the combing process. Data are shown for the first set of molecules (26.0–27.5 μm) (A, left) and for the second set (23.5–25.5 μm) (B). The labels located exactly at the extremity of the molecules are scored in black, whereas those located at an internal position are scored in grey. For the first set of molecules, the distance between the label and the closest end of the molecule is also presented (A, right).

The second set consisted of 69 molecules with a length between 23.5 and 25.5 μm . Within this set, 57 molecules (84%) exhibited a label at one of their extremities (Figs 4B, d, e and 5B). It is interesting to note that all those molecules were oriented relative to the combing direction: the label was always located on the DNA extremity that becomes attached first to the slide during the combing process. The difference between the length of both sets of molecules (26.7–24.3 μm) was the same as the distance between the label and the extremity of the lambda molecule (2.3 μm). Moreover, some of these shorter combed molecules had a larger width on the side of attachment, over a short length that does not exceed 2.5 μm (Fig. 4B d). These observations strongly support the hypothesis that the molecules of this shorter set have first bound to the slide surface at the labeling site, then the DNA on both sides of this site have completed the combing process. Folding of the molecules at the attachment point would explain the larger width of some molecules close to this site. These shorter length molecules are therefore labeled at the correct target site and the presence of the labeled fragment interferes with the combing process by providing a new internal attachment site. The results of DNA combing experiments are consistent with those obtained from gel shift experiments, showing that our strategy results in the introduction of a stable sequence-specific label on double-stranded DNA. They prove that labeled combed molecules can be observed by optical microscopy and therefore confirm the validity of our labeling strategy.

DISCUSSION

The aim of this study was to develop a new strategy to visualize a short double-stranded DNA sequence by optical microscopy. For this purpose, we linked a fluorescent DNA fragment to a TFO. This labeled fragment was efficiently catenated to lambda DNA in a sequence-specific way. Formation of a catenated complex resulted from the ligation of the sticky end of the fragment to the end of a stem-loop triplex forming oligonucleotide that is wound around its target sequence. In our previous work where the same type of stem-loop oligonucleotide was ligated to a short hairpin oligonucleotide, the complex formed by the circularized oligonucleotides and the plasmid containing the target sequence for triplex formation resisted the denaturing conditions, which proved the formation of a catenated structure (36). It is unlikely that replacing the hairpin oligonucleotide by a longer dsDNA fragment would prevent the stem-loop TFO winding around its dsDNA target. In the present work, the target is located on a linear DNA. Therefore, the structure formed by the lambda DNA and the DNA-ligated TFO should be a pseudorotaxane and the topological link formed between the two components of this structure would be disrupted upon complete denaturation. Our previous studies support the idea that TFOs that are wound around their target form triple helices that are much more stable than those made by linear TFOs. Indeed their stability approaches that of triple helices where the TFO has been linked covalently to its target. Based

on this concept, control experiments were designed. The only complex that we detected by gel shift experiments is the one where the TFO can wind around its target, which suggests that this complex has a pseudorotaxane structure. A more simple labeling strategy has been designed in which a linear TFO is ligated to a labeled DNA fragment, before or after the TFO has bound to its target sequence. However, this approach did not result in a complex that was stable enough to be observed by gel shift experiment. Thus the pseudorotaxane structure is required for formation of a very stable complex that does not dissociate during migration in a gel and during the combing process.

The labeling yield was comparable those obtained in our previous reports (60%) (24,36). It did not improve when using higher concentrations of TFOs or labeled fragments and, as previously reported, oligonucleotide quality is probably the major factor which limits the yield of these labeling procedures.

At least 20 molecules of Alexa Fluor 546 were incorporated in the 500 bp DNA fragment made by PCR, which proved to be sufficient for visualization. Statistical analysis of the position of the label on the lambda molecule showed that it was attached only to the target site. The triplex stabilizing agent (BQQ) has not been removed, which results in a very stable complex in which the TFO is not able to slide from its target sequence, as previously reported in one of our previous studies (34). Some non-specific interactions between the labels and the ends of the lambda molecule were noticed, which may be due to the presence of short single stranded sequences at the extremity of phage DNA molecules. It may also be due to the ligation of the PCR label at the end of the lambda molecule, although there is no evident base-pairing scheme that would explain such a result. Very few labels were seen at a non-specific position within the lambda DNA molecules, and no secondary binding site was observed. These non-specific signals are probably explained by an incomplete elimination of the non-bound labeled fragments.

To our knowledge, this is the first time that a non-repeated sequence as short as 15 bp has been visualized by optical microscopy. Another original feature of this approach is that the DNA sequence is recognized in its double-stranded form. Although formation of DNA triple helices is associated with certain sequence restrictions, progress has been made that extends the repertory of sequences that can be bound by TFOs (37). We have been able to use this labeling strategy on oligopurineoligopyrimidine target sequences ranging from 12 to 20 bp (not shown). There are 15 such sequences in the lambda genome, and the overrepresentation of oligopurine-oligopyrimidine sequences has been demonstrated for eukaryotic genomes (38). Moreover, our approach may be applied with other DNA recognition strategies (22,39).

Some DNA molecules were found to be anchored to the polystyrene coated surface at the labeling site. Attachment probably occurs through the single-stranded DNA surrounding the target site, since the combing process is thought to involve attachment of DNA to the slide via its single-stranded ends. If anchoring via the labeled site may be a problem if one wants to observe the precise position of a label after combing long DNA molecules, it may also be exploited to specifically capture the tagged molecules from a large pool of DNA molecules, or to attach long DNA molecules to a surface or to

a bead by an internal site and not only by its extremities, which presently remains an experimental challenge (2,3,6,7,40). The labeling strategy described here may therefore constitute a new tool for the manipulation of single DNA molecules.

Single molecule studies of DNA by optical microscopy have been carried out using YOYO-stained molecules (12,13). However, staining with a fluorescent dye may inhibit several interactions between DNA and proteins (41). The method we describe here may be used for introducing one or two labels for the localization or measurement of single DNA molecules.

Since no amplification reaction such as enzymatic DNA polymerization or successive additions of antibody layers is necessary, and the exposure time is short (100 ms), the labeled DNA molecules may be observed in real time in order to allow the visualization of dynamic behavior. It has been shown that the TFO can slide along the double helix if the triplex stabilizing agent (BQQ) is removed (34). Thus the labeled fragment described here may be displaced by DNA and RNA polymerases and proteins that translocate along double-stranded DNA (42). Therefore, the labeled fragment could be an interesting tool for the study of protein movement and may be used as a probe for observing their one-dimensional motion.

In conclusion, the labeling strategy described in this paper represents an original approach for the visualization of short sequences of double-stranded DNA by optical microscopy. This strategy may also find applications as a tool for single molecule studies of DNA and its interaction with proteins.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge insightful discussion with Ron Lebofsky. We thank Aurélien Crut for technical advice and assistance, and Jeff Sperinde for careful reading of the manuscript. B.G.-L. was supported by a grant from Ministère de la Recherche. T.R. was supported by the AFM (Association Française contre les Myopathies).

REFERENCES

1. Tiner, W.J., Sr, Potaman, V.N., Sinden, R.R. and Lyubchenko, Y.L. (2001) The structure of intramolecular triplex DNA: atomic force microscopy study. *J. Mol. Biol.*, **314**, 353–357.
2. Strick, T., Allemand, J., Croquette, V. and Bensimon, D. (2000) Twisting and stretching single DNA molecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **74**, 115–140.
3. Wang, M.D., Schnitzer, M.J., Yin, H., Landick, R., Gelles, J. and Block, S.M. (1998) Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science*, **282**, 902–907.
4. Harada, Y., Funatsu, T., Murakami, K., Nonoyama, Y., Ishihama, A. and Yanagida, T. (1999) Single-molecule imaging of RNA polymerase–DNA interactions in real time. *Biophys. J.*, **76**, 709–715.
5. Strick, T.R., Croquette, V. and Bensimon, D. (2000) Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature*, **404**, 901–904.
6. Davenport, R.J., Wuite, G.J., Landick, R. and Bustamante, C. (2000) Single-molecule study of transcriptional pausing and arrest by *E. coli* RNA polymerase. *Science*, **287**, 2497–2500.
7. Maier, B., Bensimon, D. and Croquette, V. (2000) Replication by a single DNA polymerase of a stretched single-stranded DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 12002–12007.
8. Ha, T., Rastnik, I., Cheng, W., Babcock, H.P., Gauss, G.H., Lohman, T.M. and Chu, S. (2002) Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the *Escherichia coli* Rep helicase. *Nature*, **419**, 638–641.

9. Kabata,H., Kurosawa,O., Arai,I., Washizu,M., Margaron,S.A., Glass,R.E. and Shimamoto,N. (1993) Visualization of single molecules of RNA polymerase sliding along DNA. *Science*, **262**, 1561–1563.
10. Washizu,M., Kurosawa,O., Arai,I., Suzuki,S. and Shimamoto,N. (1995) Applications of electrostatic stretch-and-positioning of DNA. *IEEE Trans. Ind. Appl.*, **31**, 447–456.
11. Harada,Y., Ohara,O., Takatsuki,A., Itoh,H., Shimamoto,N. and Kinoshita,K.,Jr (2001) Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nature*, **409**, 113–115.
12. Ladoux,B., Quivy,J.P., Doyle,P., du Roure,O., Almouzni,G. and Viovy,J.L. (2000) Fast kinetics of chromatin assembly revealed by single-molecule videomicroscopy and scanning force microscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 14251–14256.
13. Matsuura,S., Komatsu,J., Hirano,K., Yasuda,H., Takashima,K., Katsura,S. and Mizuno,A. (2001) Real-time observation of a single DNA digestion by lambda exonuclease under a fluorescence microscope field. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e79.
14. Bensimon,A., Simon,A., Chiffaudel,A., Croquette,V., Heslot,F. and Bensimon,D. (1994) Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science*, **265**, 2096–2098.
15. Michalet,X., Ekong,R., Fougerousse,F., Rousseaux,S., Schurra,C., Hornigold,N., van Slegtenhorst,M., Wolfe,J., Povey,S., Beckmann,J.S. and Bensimon,A. (1997) Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science*, **277**, 1518–1523.
16. Aston,C., Mishra,B. and Schwartz,D.C. (1999) Optical mapping and its potential for large-scale sequencing projects. *Trends Biotechnol.*, **17**, 297–302.
17. Gueroui,Z., Place,C., Freyssingas,E. and Berge,B. (2002) Observation by fluorescence microscopy of transcription on single combed DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 6005–6010.
18. Nielsen,P.E. (1999) Peptide nucleic acid: a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 16–20.
19. Thuong,T.N. and Hélène,C. (1993) Sequence-specific recognition and modification of double-helical DNA by oligonucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 666–690.
20. Dervan,P.B. and Bürli,R.W. (1999) Sequence-specific DNA recognition by polyamides. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 688–693.
21. Kuhn,H., Demidov,V.V. and Frank-Kamenetskii,M.D. (1999) Topological links between duplex DNA and a circular DNA single strand. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **38**, 1446–1449.
22. Potaman,V.N., Lushnikov,A.Y., Sinden,R.R. and Lyubchenko,Y.L. (2002) Site-specific labeling of supercoiled DNA at the A+T rich sequences. *Biochemistry*, **41**, 13198–13206.
23. Escudé,C., Garestier,T. and Hélène,C. (1999) Padlock oligonucleotides for duplex DNA based on sequence-specific triple helix formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 10603–10607.
24. Roulon,T., Coulaud,D., Delain,E., Lecam,E., Hélène,C. and Escudé,C. (2002) Padlock oligonucleotides as a tool for labeling superhelical DNA. *Nucleic Acids Res.*, **30**, e12.
25. Cherny,D.I., Malkov,V.A., Volodin,A.A. and Frank-Kamenetskii,M.D. (1993) Electron microscopy visualization of oligonucleotide binding to duplex DNA via triplex formation. *J. Mol. Biol.*, **230**, 379–383.
26. Svinarchuk,F., Cherny,D., Debin,A., Delain,E. and Malvy,C. (1996) A new approach to overcome potassium-mediated inhibition of triplex formation. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3858–3865.
27. Pfannschmidt,C., Schaper,A., Heim,G., Jovin,T.M. and Langowski,J. (1996) Sequence-specific labeling of superhelical DNA by triple helix formation and psoralen crosslinking. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1702–1709.
28. Oana,H., Ueda,M. and Washizu,M. (1999) Visualization of a specific sequence on a single large DNA molecule using fluorescence microscopy based on a new DNA-stretching method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **265**, 140–143.
29. Taylor,J.R., Fang,M.M. and Nie,S. (2000) Probing specific sequences on single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles. *Anal. Chem.*, **72**, 1979–1986.
30. Zijlmans,J.M., Martens,U.M., Poon,S.S., Raap,A.K., Tanke,H.J., Ward,R.K. and Lansdorp,P.M. (1997) Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 7423–7428.
31. Johnson,M.D.,III and Fresco,J.R. (1999) Third-strand *in situ* hybridization (TISH) to non-denatured metaphase spreads and interphase nuclei. *Chromosoma*, **108**, 181–189.
32. Maeshima,K., Janssen,S. and Laemmli,U.K. (2001) Specific targeting of insect and vertebrate telomeres with pyrrole and imidazole polyamides. *EMBO J.*, **20**, 3218–3228.
33. Zain,R., Marchand,C., Sun,J.-S., Nguyen,C.H., Bisagni,E., Garestier,T. and Hélène,C. (1999) Design of a triple-helix-specific cleaving reagent. *Chem. Biol.*, **6**, 771–777.
34. Roulon,T., Hélène,C. and Escudé,C. (2001) A ligand-modulated padlock oligonucleotide for supercoiled plasmids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **40**, 1523–1526.
35. Allemand,J.F., Bensimon,D., Jullien,L., Bensimon,A. and Croquette,V. (1997) pH-dependent specific binding and combing of DNA. *Biophys. J.*, **73**, 2064–2070.
36. Roulon,T., Hélène,C. and Escudé,C. (2002) Coupling targeting peptides to supercoiled plasmids using a new type of padlock oligonucleotide. *Bioconjug. Chem.*, **13**, 1134–1139.
37. Sun,J.S. (1999) New targets for triple helix forming oligonucleotides. In Malvy,C., Harrel-Bellan,A. and Pritchard,L.L. (eds), *Triple Helix Forming Oligonucleotides*. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, The Netherlands, pp. 273–284.
38. Behr,M.J. (1995) An overabundance of long oligopurine tracts occurs in the genome of simple and complex eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 689–695.
39. Demidov,V.V., Kuhn,H., Lavrentieva-Smolina,I.V. and Frank-Kamenetskii,M.D. (2001) Peptide nucleic acid-assisted topological labeling of duplex DNA. *Methods*, **23**, 123–131.
40. Bockelmann,U., Thomen,P., Essevez-Roulet,B., Viasnoff,V. and Heslot,F. (2002) Unzipping DNA with optical tweezers: high sequence sensitivity and force flips. *Biophys. J.*, **82**, 1537–1553.
41. Meng,X., Cai,W. and Schwartz,D.C. (1996) Inhibition of restriction endonuclease activity by DNA binding fluorochromes. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **13**, 945–951.
42. Firman,K. and Szczelkun,M.D. (2000) Measuring motion on DNA by the type I restriction endonuclease EcoR124I using triplex displacement. *EMBO J.*, **19**, 2094–2102.

4 Interaction d'EcoRV avec des molécules d'ADN étirées

4.1 Motivation : diffusion facilitée des protéines le long de l'ADN

Un nombre important de protéines interagissant avec l'ADN agissent en des sites spécifiques. Leur action (coupure, méthylation,...) nécessite la localisation de courtes séquences, en général de quelques paires de bases, sur des molécules d'ADN pouvant en compter plusieurs milliers (ADN des bactériophages), voire plusieurs millions (ADN chromosomique). Parmi ces protéines, beaucoup localisent leur séquence cible avec une efficacité extraordinaire, et ce sans consommer d'énergie. Riggs et al. ont observé dès 1970 que l'association du répresseur Lac sur l'ADN est caractérisée par une constante d'association $k_A = 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [107]. Cette constante d'association est remarquablement élevée, et ne peut être expliquée par un modèle de diffusion tridimensionnelle des enzymes vers leur site d'activité, qui conduirait à des valeurs de 10^7 à $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [108]. A la suite de cette étude, de nombreux biochimistes se sont interrogés sur les mécanismes à l'origine de cette localisation accélérée. Ils ont constaté en particulier que la localisation d'une séquence cible est plus rapide lorsque celle-ci est entourée de fragments d'ADN non spécifiques. L'effet s'accroît lorsque la longueur des fragments augmente, et sature pour une longueur des fragments excédant quelques centaines de paires de bases. La plupart de ces études ont été menées sur le répresseur Lac [109] et sur des enzymes de restriction [110, 111, 112].

Mécanismes microscopiques pour la diffusion facilitée

Plusieurs mécanismes de diffusion dans le domaine d'une molécule d'ADN ont été proposés par les biochimistes pour expliquer ces taux d'association élevés. Ils sont rassemblés sous la dénomination de "diffusion facilitée", et nous avons conservé dans ce mémoire leur terminologie anglo-saxonne (figure 17). Le "sliding" est une diffusion unidimensionnelle le long des molécules d'ADN et suit un sillon de l'ADN, dans un mouvement censé être hélicoïdal. Le "hopping" consiste en une suite d'associations-dissociations sur l'ADN, chaque association étant séparée de la suivante par une diffusion tridimensionnelle sur une petite distance, jusqu'à 20 bp. Le "jumping" implique des sauts plus longs, qui peuvent représenter plusieurs milliers de bp, même si les deux portions de l'ADN, replié, sont proches l'une de l'autre (figure 17). Enfin, l'"intersegment transfer" exige que la protéine ait deux sites de liaison avec l'ADN. Nous ne considérerons plus ce mécanisme dans la suite, EcoRV ne comportant qu'un site. Dans la littérature, ces processus de diffusion sont définis un peu différemment d'un article à l'autre. La classification utilisée ici est celle de Steven Halford [113, 114] et Alfred Pingoud [115]. Ces mécanismes ont tous en commun de réduire la dimension de l'espace de recherche, et donc d'accélérer la localisation d'une séquence-cible. Signalons qu'un nouveau mécanisme de type "sliding" a été récemment proposé, dans lequel le mouvement se produirait sur la surface entière des molécules d'ADN (mouvement 2D sur un cylindre) [116], voire dans un petit volume autour des molécules d'ADN [117]. En pratique, les expériences de biochimie sont souvent analysées en terme d'une combinaison de mécanismes 1D et 3D, combinaison qui permet de minimiser le temps nécessaire à la localisation des séquences-cibles [113, 118]. Le sliding permet en effet d'explorer base par base de petits domaines, généralement disjoints et reliés entre eux par des sauts plus ou moins longs (figure 17). Cette combinaison rend la recherche moins redondante que dans un mouvement de "sliding" seul, qui permet néanmoins l'exploration base par base d'un petit domaine avant dissociation, rendant la combinaison plus efficace que le hopping seul.

Un modèle simple permet d'estimer le temps nécessaire à l'exploration d'une molécule d'ADN

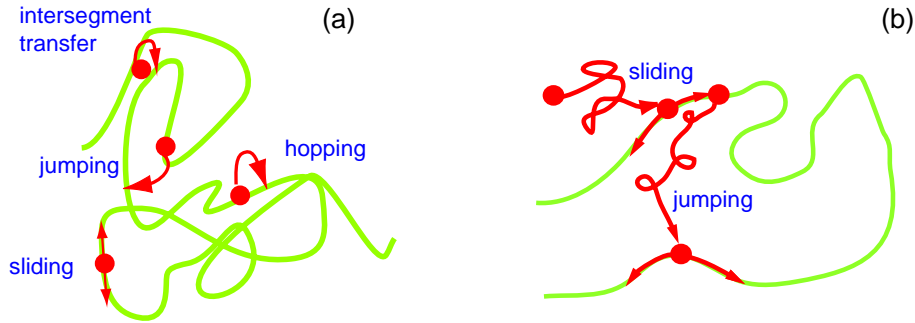


FIG. 17 – (a) Mécanismes de diffusion à l'intérieur d'une pelote d'ADN. (b) Localisation des séquences-cibles par alternance de phases de diffusion 1D (sliding) et 3D (hopping/jumping).

de longueur L grande devant la longueur de persistance de l'ADN. Une protéine alterne des phases de diffusion le long de l'ADN (sliding) et des phases de diffusion 3D (hopping) à l'intérieur du domaine constitué par la molécule d'ADN. Dans ce modèle, toute dissociation de la protéine hors de ce domaine est négligée. Les phases de sliding sont caractérisées par un coefficient de diffusion D_1 le long de l'ADN et une longueur moyenne l_1 de la zone explorée avant dissociation. Les phases de hopping sont caractérisées par un coefficient de diffusion tridimensionnelle D et une distance moyenne l entre les sites de dissociation et de réassociation. Cette longueur l dépend de la conformation de la molécule d'ADN et de sa longueur. Dans le cas d'une pelote modélisée par une chaîne librement jointe, elle est estimée à $\sqrt{LL_p}$ [119], où $L_p = 50$ nm est la "longueur de persistance" de l'ADN. La durée moyenne d'une phase de sliding est l_1^2/D_1 , et la durée moyenne d'une phase de hopping est l^2/D .

Pour simplifier le calcul, nous faisons l'hypothèse que les zones explorées par sliding sont disjointes. La molécule entière est alors explorée à l'issue de L/l_1 événements d'association. Le temps nécessaire à la localisation de la séquence-cible est donc de l'ordre de :

$$\tau(l_1) = L/l_1(l_1^2/D_1 + l^2/D).$$

Ce temps devient très élevé pour $l_1 \rightarrow 0$ (hopping seul), car le nombre d'événements d'association/dissociation, de durée non nulle, est alors très grand, ainsi que pour $l_1 \rightarrow L$ (sliding seul) en raison de la durée proportionnelle à l_1^2 des phases de sliding. Il passe par un unique minimum l_1 lorsque les phases de diffusion 1D sur l'ADN (sliding) et 3D dans la pelote (hopping) ont même durée :

$$l_1 = \sqrt{\frac{LL_p D_1}{D}}. \quad (5)$$

Pour une molécule d'ADN du bactériophage T7 utilisé dans nos expériences, de longueur 40 kb soit $13 \mu\text{m}$, l est de l'ordre de $0.6 \mu\text{m}$. Le rapport D_1/D peut être estimé à l'aide de considérations hydrodynamiques [120], sur lesquelles nous reviendrons en détails. Il dépend de la taille de la protéine impliquée et a une valeur d'environ 1/10 pour une protéine de taille nanométrique. Finalement, $l_1 \simeq 0.2 \mu\text{m} \simeq 600$ paires de bases. Ce modèle simple permet de prédire une longueur de sliding optimale de l'ordre du millier de paires de bases sur les ADN de bactériophages. Comme nous le verrons dans la partie suivante, cette valeur est cohérente avec celle qui a été prévue par Jeltsch et Pingoud pour l'enzyme EcoRV [121].

Des protéines bien adaptées à cette étude : les enzymes de restriction de type II

Les bactériophages sont des virus capables d'injecter leur matériel génétique à l'intérieur d'une bactérie, dans le but d'utiliser sa machinerie pour se multiplier. Pour se protéger de leurs attaques, les bactéries utilisent des systèmes de restriction-modification qui permettent de détruire l'ADN viral tout en protégeant l'ADN bactérien. Il existe trois types différents de systèmes de restriction/modification. Dans les systèmes de types I et III, les activités de modification et de restriction sont assurées par la même enzyme, dont l'activité requiert la consommation d'ATP. Les systèmes de type II sont des systèmes composés de deux enzymes distinctes opérant sur une même séquence-cible : une enzyme de restriction, qui reconnaît et clive une séquence spécifique de 4 à 8 pb et une méthyltransférase, qui empêchent le clivage de l'ADN par la méthylation de la séquence-cible. Puisque la longueur de la séquence-cible d'une enzyme de restriction est courte, il est statistiquement probable qu'elle existe sur un ADN viral pris au hasard. Ainsi, une séquence de 6 bp se rencontre en moyenne tous les $4^6=4096$ pb sur l'ADN, longueur inférieure à la longueur des ADN viraux (quelques dizaines de kilobases). De plus, de nombreuses enzymes de restriction différentes, une centaine par exemple chez *E. Coli*, sont présentes chez les bactéries, ce qui permet potentiellement de couper quasiment n'importe quel ADN viral.

Une action rapide des enzymes de restriction après une invasion virale est indispensable. D'une part, le bactériophage doit être clivé avant qu'il ne parvienne à se multiplier, et d'autre part les enzymes de restriction sont en compétition cinétique avec les méthyltransférases, susceptibles de protéger l'ADN viral lui-même. Dans le cas des enzymes de restriction, la localisation rapide d'une séquence-cible conditionne donc directement la survie cellulaire.

Depuis le début des années 80, un nombre important de biochimistes se sont intéressés au problème de la localisation des séquences-cibles par les enzymes de restriction de type II, et en particulier EcoRI et EcoRV. Un grand nombre de ces expériences ont démontré la possibilité d'un mouvement de sliding *in vitro*, alors que les expériences récentes de Steven Halford ont mis en évidence l'implication des processus 3D (hopping), également *in vitro*. S'il est à présent établi que la localisation des séquences-cibles utilise conjointement ces deux mécanismes, leur importance respective fait en revanche l'objet de vifs débats depuis quelques années, comme en témoigne le nombre élevé de publications récentes sur ce sujet [113, 114, 115, 121, 122]. Je renvoie le lecteur à la thèse d'Aurélien Crut [119] pour un descriptif des expériences menées au cours des vingt dernières années par les biochimistes. Ces expériences ont une limitation fondamentale : l'interprétation de leurs résultats nécessite leur confrontation aux prédictions issues des modèles décrivant les différents mécanismes microscopiques possibles. Ces modèles sont souvent complexes et font appel à des paramètres mal connus expérimentalement, tels que le taux de dissociation pour le sliding ou la durée de l'association pour le hopping. L'interprétation de ces expériences est donc délicate et c'est la raison pour laquelle les conclusions divergent suivant les groupes. Par exemple, pour le groupe d'Alfred Pingoud, la localisation *in vitro* des séquences-cibles se fait essentiellement par diffusion unidimensionnelle le long de l'ADN (sliding). Ce groupe conclut à une exploration d'environ 1000 paires de bases avant dissociation pour les enzymes EcoRI et EcoRV. Selon Steven Halford la localisation des séquences-cibles utilise essentiellement les processus 3D, le sliding n'ayant qu'une importance très marginale. Son groupe prédit en définitive une longueur parcourue par événement de sliding inférieure à 25 paires de bases.

Expériences à l'échelle de la molécule unique

Les expériences à l'échelle de la molécule unique sont en mesure de fournir un accès direct aux caractéristiques microscopiques de la diffusion, par exemple pour la diffusion 1D sa durée et son coefficient de diffusion. Notre système est particulièrement bien adapté à l'étude de la diffusion facilitée. La microscopie de fluorescence permet d'enregistrer la trajectoire d'une enzyme marquée lors de son interaction avec l'ADN étiré, l'utilisation de la microscopie par onde évanescente permettant de travailler à des concentrations en protéines élevées. Puisque les enzymes sont supposées diffuser le long de l'ADN sans exercer de forces, les techniques décrites plus haut qui étudient l'activité enzymatique à partir des modifications de longueur de l'ADN ou du couple subi par le polymère (pinces optiques/magnétiques) ne pourraient être utilisées.

Le nombre élevé de publications concernant la diffusion facilitée de l'enzyme de restriction EcoRV nous a conduits à contacter A. Pingoud (Justus-Liebig Universität Giessen, Allemagne) pour lui proposer une collaboration. Wolfgang Wende a accepté de nous donner des échantillons de l'enzyme modifiée pour mener nos expériences. La cinétique de cette enzyme est de plus bien caractérisée, ce qui nous a permis de comparer nos résultats à ceux obtenus par les biochimistes.

A l'heure actuelle, plusieurs groupes dans le monde utilisent ces techniques en vue de déterminer précisément les mécanismes à l'œuvre pour la localisation des séquences cibles.

4.2 EcoRV marquée NCs

L'enzyme de restriction EcoRV

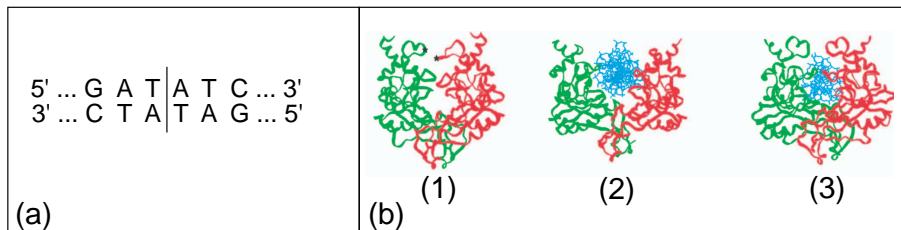


FIG. 18 – (a) Séquence-cible d'EcoRV (b) Structure d'EcoRV : (1) enzyme seule, et liée à l'ADN (en bleu) (2) sur une séquence non spécifique et (3) sur sa séquence-cible. Les deux unités constituant le dimère sont représentées en vert et en rouge.

EcoRV est une enzyme de restriction de type II. Elle se présente sous la forme d'un homodimère de masse moléculaire totale 57 kD, chaque sous-unité comportant 245 acides aminés. Cette enzyme reconnaît une séquence de 6 paires de bases sur l'ADN double-brin, qu'elle coupe en son milieu. Elle a été cristallisée en 1993 par Winkler et al. dans trois configurations différentes : libre, liée non spécifiquement à l'ADN, et fixée sur sa séquence-cible [123] (figure 18). La capacité d'EcoRV à reconnaître spécifiquement et à cliver sa séquence-cible dépend de la présence d'ions divalents. En l'absence de tels ions, EcoRV manifeste peu de spécificité pour sa séquence-cible, qu'elle est incapable de cliver [124]. En leur présence, EcoRV se lie plus fortement à sa séquence-cible qu'à l'ADN non spécifique. Cependant, sa capacité à cliver ensuite l'ADN est variable selon

les ions utilisés : le clivage est le plus efficace avec des ions Mg^{2+} , alors qu'il n'est pas observé en présence d'ions Ca^{2+} [125, 126].

Les enzymes utilisées dans les expériences présentées dans cette section sont des mutants fournis par Wolfgang Wende . Ces enzymes possèdent un groupement biotine qui a été ajouté à l'enzyme de manière spécifique. Pour cela, l'unique cystéine présente dans la structure de l'enzyme sauvage a été remplacée par une sérine (mutation C21S) et un acide aminé accessible a été remplacé par une cystéine. Trois mutants ont été élaborés, qui correspondent aux mutations K58C, T222C et Y241C (K : lysine, T : thréonine, Y : tyrosine, C : cystéine ; les chiffres correspondent à la position sur la structure primaire) (figure 19). Les mutants obtenus possèdent donc tous une unique cystéine, qui est accessible en solution contrairement à celle que possèdent les enzymes sauvages. Une biotine-maléimide peut ensuite être liée à cette cystéine. D'après les tests réalisés par W. Wende, l'activité biologique des enzymes mutantes biotinylées est la même que celle des enzymes sauvages. Notons qu'EcoRV adoptant une conformation dimérique, chaque dimère contient donc deux biotines susceptibles d'être couplées à des fluorophores.

Nous avons utilisé dans toutes les expériences le mutant K58C, qui a été couplé à des NCs couverts de streptavidine. Dans la suite du mémoire, le complexe est désigné par la dénomination "NC-EcoRV". Nous avons vérifié que les échantillons couplés sont encore actifs, nous avons également observé que le couplage des nanocristaux à EcoRV affectait leur migration sur un gel d'agarose. Enfin, nous avons observé que le complexe se lie à des billes couvertes d'héparine, un polymère analogue à l'ADN auquel les endonucléases se lient avec une constante de d'association élevée. Les protocoles de couplage et les tests d'activité sont décrits en détails dans la thèse d'Aurélien Crut [119].

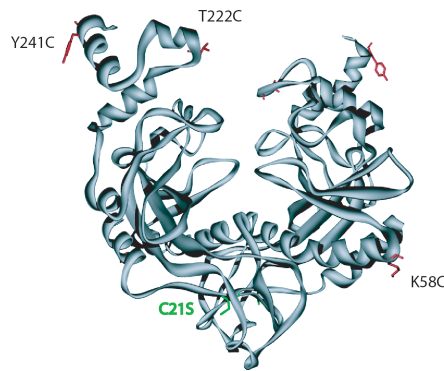


FIG. 19 – *Enzymes EcoRV mutantes produites par W. Wende (groupe d'A. Pingoud) : deux mutations ont été réalisées : C21S et, selon l'échantillon, K58C, T222C ou Y241C.*

Comme nous le verrons, les NCs nous ont permis la détection de protéines individuelles avec des résolutions spatiale (définie ici comme la précision avec laquelle il est possible de pointer la position d'un fluorophore) et temporelle compatibles à l'étude de la diffusion linéaire d'EcoRV le long de l'ADN. Ces résolutions devaient permettre de caractériser un mouvement qui a lieu sur des longueurs inférieures à $1 \mu m$ et pendant une durée de l'ordre de la seconde.

Conditions expérimentales de l'interaction de NC-EcoRV avec des molécules d'ADN de T7 étirées

Notre expérience ayant pour objectif d'observer les interactions non spécifiques entre EcoRV et l'ADN, nous avons décidé d'utiliser un ADN dénué de cibles pour cette enzyme. L'ADN λ utilisé pour développer la technique d'étirement a donc été exclu, car il possède 21 séquences-cibles pour EcoRV. D'autre part, nous souhaitions utiliser un ADN suffisamment long (quelques dizaines de kb) pour assurer une fréquence d'association EcoRV-ADN élevée. L'ADN du bactériophage T7 satisfait à ces deux contraintes : sa taille est de 39 937 pb, et il ne possède aucune séquence-cible pour EcoRV. Nous avons choisi pour détecter l'ADN le SYBR Gold (Molecular Probes), un fluorophore qui s'insère dans le petit sillon de l'ADN [127]. Meng et al. ont montré en 1996 que la présence d'intercalants (YOYO1) le long des molécules d'ADN affecte l'activité des enzymes de restriction, alors que le marquage de l'ADN avec des fluorophores qui se lient au petit sillon de l'ADN est sans effet sur l'activité de la plupart des enzymes de restriction testées [99].

Le principe de notre expérience consiste à introduire des NC-EcoRV dans une cavité à écoulement où des molécules d'ADN de T7 ont été préalablement étirées. Les conditions de cette expérience ont dû être optimisées afin d'éviter toutes les interactions indésirables : entre les nanocristaux et la surface, entre l'ADN et la surface, et entre les nanocristaux et l'ADN. Le traitement avec le Blocking Reagent, décrit dans la section précédente, nous a permis de travailler dans des conditions acceptables. Le pH de nos expériences a été soigneusement ajusté à 6,8, afin de minimiser la charge des NCs. Cette charge est due à la streptavidine présente à leur surface, dont le point isoélectrique est situé entre 6,5 et 7,0. En travaillant à un pH éloigné de ce point isoélectrique, la charge des NCs peut perturber l'interaction des NC-EcoRV avec l'ADN. Ce pH n'est pas un paramètre critique pour l'interaction d'EcoRV avec l'ADN non spécifique : Engler et al. ont montré que la constante d'association d'enzymes EcoRV sauvages à des oligonucléotides ne contenant pas sa séquence-cible était indépendante du pH, du moins dans la gamme 6,0-7,0 [128].

La fréquence des événements d'association de NC-EcoRV à une molécule d'ADN étirée est d'autant plus grande que leur concentration est élevée. Cependant, pour une détection en épifluorescence, les concentrations élevées de nanocristaux créent un fond lumineux qui diminue la qualité de détection d'un NC-EcoRV en interaction avec l'ADN ; ce problème peut être résolu par l'utilisation d'une onde évanescente pour l'excitation des nanocristaux. Cependant, l'utilisation de NC-EcoRV à des concentrations supérieures à 1 nM a une seconde conséquence plus gênante : des spots très lumineux sont alors observés sur les molécules étirées. Ces spots ne se dissocient en général pas des molécules d'ADN. Il pourrait s'agir d'agrégats de NC-EcoRV qui interagissent avec l'ADN par plusieurs enzymes. Après quelques essais, nous avons conclu que la concentration optimale en NC-EcoRV était de l'ordre de 0.25 à 0.5 nM. En effet, la fréquence des événements d'association est satisfaisante dans ce cas (typiquement un événement par minute et par molécule étirée) alors que la présence d'agrégats "permanents" sur l'ADN est rare. Dans cette gamme de concentrations, l'utilisation d'une onde évanescente n'est plus une nécessité absolue.

Résultats

Le principe de nos expériences consiste à étirer des molécules d'ADN de T7, puis à les mettre en présence de NC-EcoRV dans une solution de composition contrôlée. Une fois ceci réalisé, la lame est explorée pour trouver une molécule d'ADN étirée. Une image de l'ADN est enregistrée, puis nous changeons le jeu de filtres utilisé, de manière à détecter cette fois les NC-EcoRV ; un

film est alors réalisé. Si la molécule d'ADN casse, la lame est explorée à nouveau pour en trouver une autre et recommencer la même procédure.

Sur les films réalisés, on observe fréquemment des événements d'association de NC-EcoRV à l'ADN ; les nanocristaux restent sur l'ADN pendant une durée de l'ordre de la seconde puis s'en dissocient (figure 20). Afin de vérifier que ces événements sont bien dus à la présence d'EcoRV

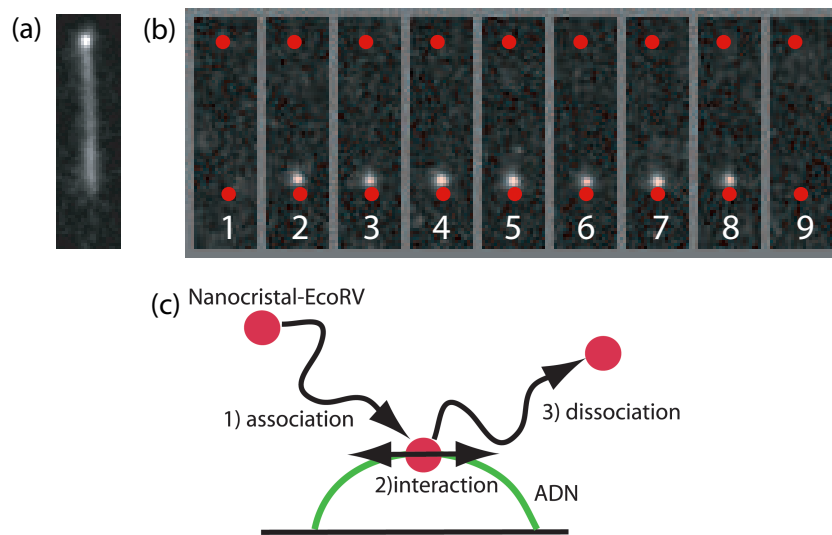


FIG. 20 – Association d'un NC-EcoRV à l'ADN : (a) image d'une molécule d'ADN étirée marquée au SYBR Gold (longueur apparente : environ $10\ \mu\text{m}$), (b) extraits d'un film réalisé sur la même zone, qui montre l'association entre les images 1 et 2 d'un NC-EcoRV à la molécule d'ADN, puis sa dissociation entre les images 8 et 9, après environ 2 s. Les points rouges indiquent la position des extrémités de la molécule d'ADN. La durée entre chaque image est 200 ms. (c) Représentation schématique de l'événement observé.

à la surface des nanocristaux, une expérience témoin a été réalisée avec des nanocristaux seuls, dans les mêmes conditions expérimentales. Aucune interaction des nanocristaux avec l'ADN n'a pu être observée, même en augmentant à $1\ \text{nM}$ la concentration en nanocristaux.

Nous avons exploré 3 conditions de salinités différentes, afin de tester l'influence de ce paramètre sur l'interaction des NC-EcoRV avec l'ADN.

- 66 événements du type de celui présenté sur la figure 20 ont été observés sur l'ensemble des expériences réalisées à $25\ \text{mM NaCl}$.
- 83 événements ont été observés à $50\ \text{mM NaCl}$.
- 117 événements ont été observés à $75\ \text{mM NaCl}$.

Les films réalisés contiennent essentiellement deux informations sur l'interaction des NC-EcoRV avec l'ADN : la distribution des temps d'interaction des NC-EcoRV avec l'ADN, et une éventuelle diffusion le long de l'ADN, caractérisée par un coefficient de diffusion D . On peut déduire de ces deux paramètres la longueur moyenne explorée par un NC-EcoRV pendant un événement d'association avec l'ADN. Nous présenterons de plus un modèle qui permet d'estimer la valeur du coefficient de diffusion et de la longueur moyenne explorée pour une enzyme non couplée.

Le temps d'interaction est mesuré entre la première apparition d'un spot sur l'ADN et la dernière image du film où on aperçoit ce même spot sur l'ADN, même si entre ces deux limites le spot "clignote". Les temps mesurés peuvent être légèrement affectés par le clignotement des NCs si certains des spots pris en compte sont dans un état noir au début où à la fin de leur interaction avec l'ADN.

Les distributions obtenues dans chacune des trois conditions salines testées sont représentées sur la figure 21, sur laquelle figurent également les cumulatives associées. Ces cumulatives donnent, pour une durée donnée, le nombre d'événements de durées inférieures, et évitent ainsi le regroupement de valeurs (binning) inhérent à la construction d'histogrammes. Nous avons éliminé les événements "longs" (plus de 10s) qui correspondent souvent à des complexes liés définitivement avec l'ADN (interaction de deux enzymes sur un même nanocrystal avec l'ADN? interaction entre une enzyme marquée et une enzyme non marquée?).

A 25 mM NaCl (66 événements analysés), l'interpolation de la distribution obtenue avec une distribution exponentielle est satisfaisante, et fournit un temps moyen d'interaction $\tau=2,2$ s. A 50 mM NaCl, la distribution des temps d'interaction est interpolée par une distribution exponentielle avec un temps $\tau=0.7$ s (83 événements analysés). A 75 mM NaCl, la distribution obtenue est interpolée par une distribution exponentielle à condition de ne pas considérer les points correspondant à des temps d'interaction supérieure à 2 s (voir la figure 21); on obtient alors un temps $\tau=0.4$ s (117 événements analysés). Dans cette condition de salinité, la condition énoncée ci-dessus (ne considérer que les temps d'interaction inférieur à 10 s) n'est sans doute pas suffisante pour éliminer les spots ne correspondant pas à l'interaction d'un NC-EcoRV unique *via* une seule enzyme.

Nos résultats montrent que la durée de l'interaction des NC-EcoRV avec l'ADN diminue lorsque la concentration en NaCl augmente. Ce résultat était prévisible : la présence de sel réduit la portée des interactions électrostatiques entre EcoRV et l'ADN et diminue donc leur affinité. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles déduites des expériences de cinétique menées par des biochimistes [129]. Nos expériences ont donc montré qu'un NC-EcoRV restait lié à l'ADN pendant environ 1 s avant de s'en dissocier. En supposant que l'ordre de grandeur de la durée d'interaction d'une enzyme EcoRV non couplée avec l'ADN est identique, et que pendant cette durée l'enzyme ne diffuse pas le long de l'ADN, le temps moyen mis par une enzyme pour localiser sa séquence-cible sur un ADN de plusieurs milliers de bases serait donc de l'ordre de l'heure, en supposant que l'enzyme se réassocie rapidement à l'ADN après chaque dissociation. Cette durée est très supérieure à celle que l'on obtiendrait par une diffusion 3D pure, sans interaction avec l'ADN non spécifique. Elle est de plus incompatible avec la constante d'association d'EcoRV à sa séquence-cible sur un plasmide d'environ 4 kb, $k_a \simeq 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mesurée à partir d'études cinétiques [129]. En effet, comme $d[E - ADN]/dt = k_a[E][ADN]$, cette valeur implique qu'en présence de 10 nM de cibles, le temps nécessaire à une enzyme pour localiser sa séquence-cible est de l'ordre de 1 s. Les longues durées d'interaction NC-EcoRV/ADN mesurées constituent donc un premier indice, suggérant l'existence d'un mouvement d'EcoRV sur l'ADN pendant la durée de l'interaction, de manière à explorer plus d'une paire de bases. La partie suivante de ce chapitre montre comment l'analyse des trajectoires des NC-EcoRV au cours de leur interaction avec les molécules d'ADN permet de prouver directement l'existence d'un mouvement de diffusion le long de l'ADN.

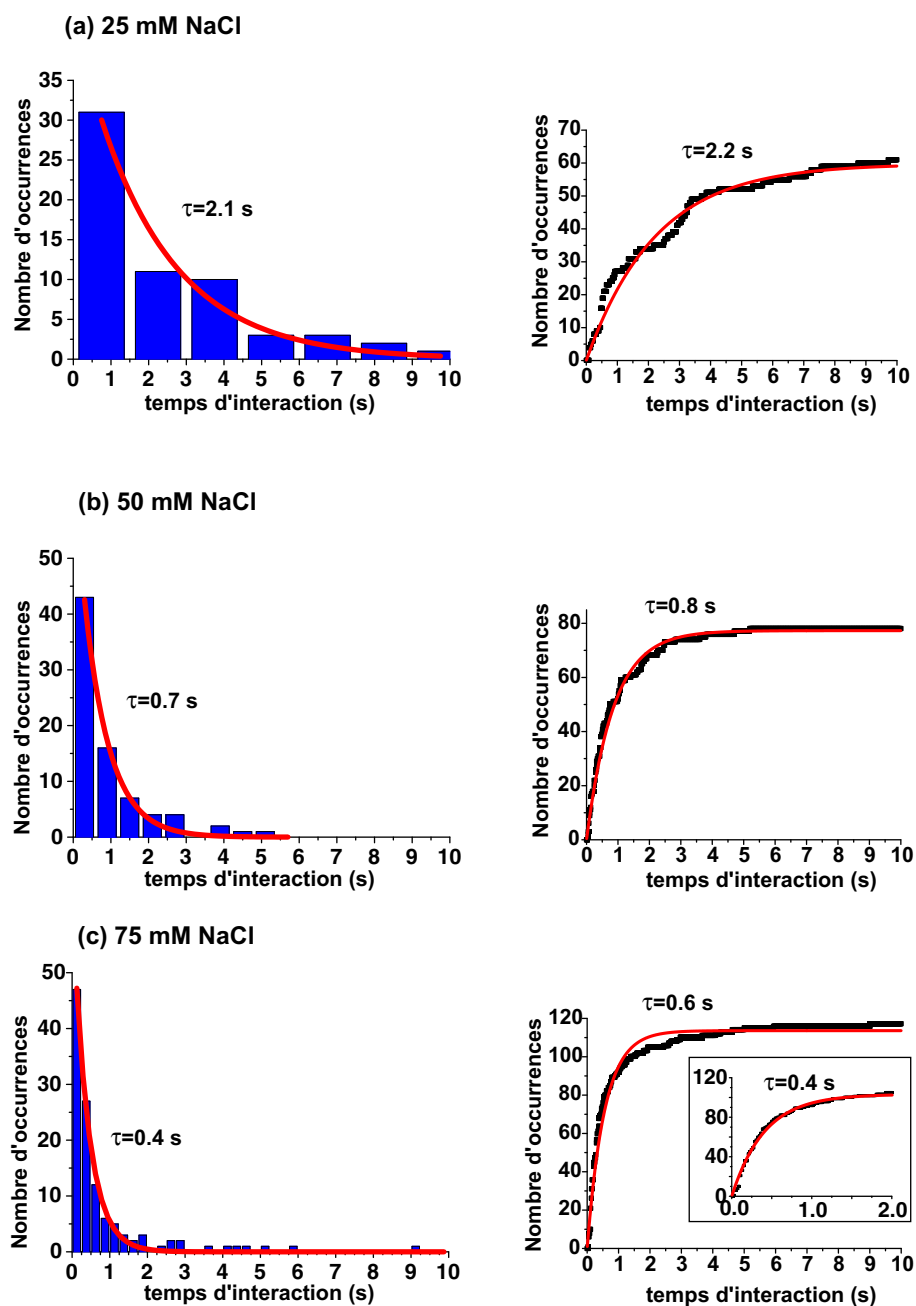


FIG. 21 – Histogrammes et cumulatives des temps d'interaction NC-EcoRV/ADN à (a) 25 mM NaCl, (b) 50 mM NaCl et (c) 75 mM NaCl. Dans chaque cas, une interpolation correspondant à une distribution exponentielle des temps d'interaction est présentée, ainsi que le temps résultant. La courbe encadrée pour la distribution cumulative à 75 mM correspond à une analyse limitée arbitrairement aux événements d'interaction dont la durée est inférieure à 2 s.

Diffusion facilitée et déplacement quadratique moyen.

Sur chaque image des films expérimentaux, la position du fluorophore est estimée à l'aide d'un ajustement gaussien 2D. Le centre de la gaussienne obtenue est associée à la position

du nanocristal et donc de l'enzyme (figure 22). Nous avons utilisé des spots immobiles sur la surface (NCs adsorbés, souvent individuels comme en témoigne leur clignotement) pour estimer la résolution spatiale avec laquelle sont détectés les NCs dans nos conditions expérimentales (temps d'exposition de 20 ms, caméra intensifiée Pentamax, surfaces de polystyrène). Suivant les films, cette résolution varie de 10 à 15 nm. Elle peut être comparée à celle attendue en considérant la taille des pixels et le nombre de photons détectés, de l'ordre de 10 nm [119]. Le déplacement d'un NC-EcoRV lié à l'ADN pendant $t_{\text{exp}}=20$ ms est également de l'ordre de la dizaine de nanomètres. En effet, comme nous le verrons, les coefficients de diffusion associés à la diffusion de l'enzyme sur l'ADN sont de 3 à 4 ordres de grandeurs inférieurs au coefficient en solution, et les fluctuations transverses d'une molécule de T7 étirée à 75% ont une amplitude de quelques dizaines de nanomètres et un temps de corrélation de l'ordre du temps d'exposition. Ce déplacement élargit donc légèrement le spot associé sur chaque image. La résolution spatiale associée à la détection de ces spots n'est donc pas sensiblement dégradée par rapport à celle mesurée dans le cas des spots fixes (10 nm environ).

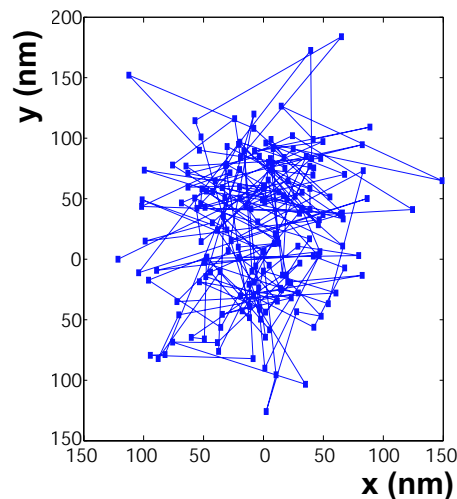


FIG. 22 – Position d'un spot pendant sa phase d'interaction avec l'ADN (l'ADN étiré est orienté selon la direction y).

L'analyse des trajectoires obtenues doit tenir compte des deux origines distinctes du mouvement des NC-EcoRV le long de l'ADN : un mouvement fluctuant et confiné résultant de celui de l'ADN étiré, et un mouvement de diffusion le long de l'ADN. Un modèle billes-ressorts permet de décrire le mouvement thermique du contour des molécules d'ADN. L'amplitude maximale du mouvement longitudinal, au milieu d'une molécule d'ADN T7 entière, est $\sqrt{\langle y^2 \rangle} \simeq 100$ nm (respectivement 50 nm) pour un taux d'étirement de 0.7 (respectivement 0.8). Ces longueurs correspondent environ à 400 (respectivement 200) pb d'ADN étiré. Le temps de corrélation du mouvement longitudinal est de 20 ms (respectivement 5 ms) pour un taux d'étirement de 0.7 (respectivement 0.8). Le mouvement de diffusion des NC-EcoRV le long de l'ADN n'a pas nécessairement une amplitude plus grande que celle du mouvement dû au mouvement thermique des molécules d'ADN. Il peut donc paraître à première vue difficile de distinguer ces deux processus. Cependant, les fluctuations thermiques de l'ADN sont caractérisées par un temps de corrélation transverse/longitudinal, de l'ordre de 10-100 ms, petit devant la durée totale des films expériment-

taux, alors que les mouvements diffusifs n'ont pas de temps d'évolution caractéristique. Comme nous allons le voir, cette différence peut être exploitée pour séparer les deux mouvements, en calculant et en analysant la dépendance temporelle du déplacement quadratique moyen.

Le déplacement quadratique moyen d'une grandeur $x(t)$ est défini par :

$$g(\tau) = \langle (x(t + \tau) - x(t))^2 \rangle,$$

où $\langle \rangle$ désigne la moyenne temporelle. Soustraire à x sa valeur moyenne ne change pas la valeur de g . On supposera donc dans la suite que $\langle x \rangle = 0$. Dans un premier temps, nous allons évaluer g pour les trois types de mouvements qui se présentent dans nos expériences : un spot immobile sur une surface, un spot fixe sur une molécule étirée et un mouvement de diffusion.

a) Calcul du déplacement quadratique moyen dans le cas d'un spot immobile : en supposant que $x(t)$ et $x(t + \tau)$ sont des variables aléatoires indépendantes, de variance σ^2 liée au processus de mesure de leur position, il vient :

$$g(\tau) = 2\sigma^2,$$

pour $\tau \neq 0$ car $\langle x(t) \rangle = \langle x(t + \tau) \rangle = \langle x^2 \rangle = 0$ et $\langle x(t)x(t + \tau) \rangle = 0$. Pour des spots détectés avec une précision de 15 à 20 nm, on attend donc que $g(\tau)$ soit constante au cours du temps et de l'ordre de 4 à 8 $10^{-4} \mu\text{m}^2$.

b) Calcul du déplacement quadratique moyen dans le cas d'un spot fixe sur une molécule d'ADN étirée : le mouvement transverse (longitudinal) d'un point d'une molécule d'ADN est associé une fonction d'autocorrélation de la forme $\langle x(t)x(t + \tau) \rangle = X^2 e^{-\tau/\tau_x}$ ($\langle y(t)y(t + \tau) \rangle = Y^2 e^{-\tau/\tau_y}$), où X^2 (Y^2) désigne l'amplitude quadratique moyenne des fluctuations transverses (longitudinales) et τ_x (τ_y) leur temps de corrélation. Il vient alors :

$$g_x(\tau) = 2X^2(1 - e^{-\tau/\tau_x}), \quad g_y(\tau) = 2Y^2(1 - e^{-\tau/\tau_y}).$$

Le mouvement longitudinal d'un point d'une molécule étirée à 70 % a une amplitude Y^2 approximativement égale à $10^{-2} \mu\text{m}^2$. Il en résulte une valeur aux temps longs d'environ $2 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2$ pour g . Dans nos expériences, la valeur du temps de corrélation des fluctuations τ_y est proche de celle du temps d'exposition utilisé (10 à 50 ms selon les expériences). Il est donc difficile de mettre en évidence la phase de croissance de g vers sa valeur limite.

c) Calcul du déplacement quadratique moyen dans le cas d'un mouvement diffusif pur : en utilisant la définition même du coefficient de diffusion D , on obtient dans le cas d'un mouvement de diffusion unidimensionnelle :

$$g(\tau) = 2D\tau,$$

où D est le coefficient de diffusion à 1D.

d) Combinaison de mouvements indépendants : supposons que la position y puisse s'écrire comme la somme de deux variables indépendantes : $y = y_1 + y_2$. Alors $g(\tau) = \langle (y(t + \tau) - y(t))^2 \rangle = \langle (y_1(t + \tau) - y_1(t))^2 \rangle + \langle (y_2(t + \tau) - y_2(t))^2 \rangle = g_1(\tau) + g_2(\tau)$; en effet les termes croisés en $\langle y_1 y_2 \rangle$ sont nuls car y_1 et y_2 sont deux variables indépendantes et de moyenne nulle.

Dans nos expériences, les fluctuations longitudinales et la diffusion le long des molécules d'ADN ne sont en toute rigueur pas indépendantes : la diffusion change la position des enzymes sur les molécules étirées et affecte donc l'amplitude et le temps caractéristique de leur mouvement de fluctuations longitudinales. Cependant, cet effet peut être négligé car la distance sur laquelle les enzymes diffusent au cours d'un événement d'interaction avec l'ADN est petite comparée à la longueur totale des molécules d'ADN étirées. Le déplacement quadratique moyen pour un mouvement combinant fluctuations et diffusion est donc de la forme :

$$g(\tau) = 2\sigma^2 + 2D\tau,$$

le paramètre σ réunissant ici précision de pointé du complexe NC-EcoRV et fluctuations longitudinales de l'ADN étiré, en supposant que le temps de corrélation de ces dernières est inférieur au temps d'exposition. L'analyse des films expérimentaux a été menée sur des films dont la longueur est supérieure à 50 images, exempts de clignotement et sur lesquels la trajectoire des spots considérés ne présentait pas de discontinuité apparente. Une trajectoire typique est donnée sur la figure 22 (obtenue par l'analyse de 180 images consécutives d'un film expérimental réalisé avec un temps d'exposition de 47 ms, à 25 mM NaCl). Les déplacements quadratiques moyens selon les directions transverse et longitudinale, obtenus à partir de la trajectoire expérimentale, et leurs interpolations linéaires sont représentés sur la figure 23.

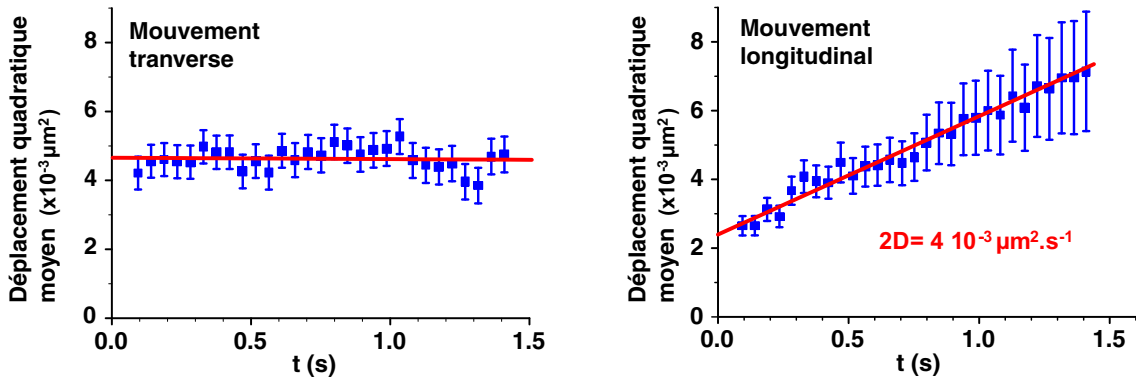


FIG. 23 – Déplacement quadratique moyen dans les directions transverse et longitudinale (30 premiers points).

Dans l'exemple présenté comme dans la plupart des films analysés, le déplacement quadratique moyen suivant la direction transverse est constant, alors que le déplacement quadratique moyen suivant la direction longitudinale dépend linéairement du temps sur l'intervalle considéré, conformément à ce que l'on attend pour un mouvement de diffusion 1D le long de la molécule d'ADN. Il est alors possible d'extraire un coefficient de diffusion D à partir de cette courbe, le coefficient directeur du déplacement quadratique moyen étant égal à $2D$. La qualité de l'ajustement par une droite et donc la précision avec laquelle est estimé D varient d'un film à l'autre. En effet, les erreurs statistiques sur le calcul du déplacement quadratique dépendent du nombre d'images analysées ainsi que de l'amplitude des fluctuations de l'ADN, paramètres qui peuvent varier d'une molécule à l'autre [119]. Le tableau ci-dessous résume nos résultats :

[NaCl] (mM)	25	50	75
Nombre d'événements analysés	10	7	6
$D(\times 10^{-3} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1})$	4.3 ± 3.9	3.4 ± 3.4	5.1 ± 4.9
Temps d'interaction moyen (s)	2.2	0.8	0.6
Longueur parcourue moyenne (pb)	380	200	180

La distance moyenne L_{moy} explorée pendant un événement d'interaction avec l'ADN a été estimée en utilisant la relation $L_{\text{moy}}^2 = 2D_{\text{moy}}t_{\text{moy}}$. Selon ces résultats, D ne dépend pas, ou peu, de la concentration en sel (ce résultat tendrait d'ailleurs à prouver que le mécanisme sous-jacent à la diffusion facilitée est le sliding, comme nous l'expliquerons un peu plus tard dans cette section). La figure (24) donne la distribution des coefficients de diffusion, réunis sans tenir compte de la salinité. Cette distribution est très large, nous la commenterons dans la suite de l'exposé.

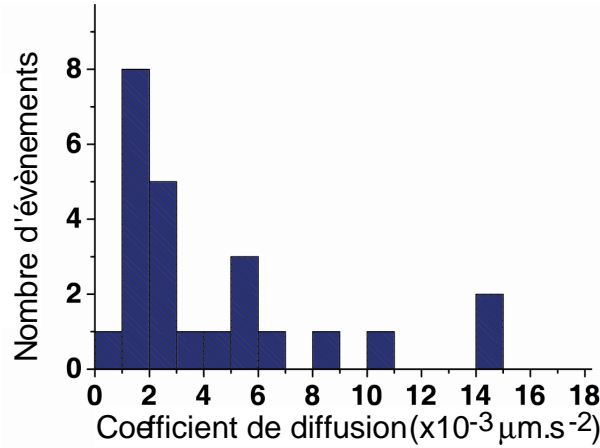


FIG. 24 – Distribution des coefficients de diffusion D du complexe NC-EcoRV le long de l'ADN étiré. La valeur la plus fréquemment mesurée est de l'ordre de $2 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, plus petite que la moyenne de D , de l'ordre de $4 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Cet écart est dû aux grandes valeurs de D parfois observées.

Sauts

Sur quelques films expérimentaux, nous avons observé un brusque "saut" des NC-EcoRV au cours de leur interaction avec l'ADN, détectable directement sur les films expérimentaux et sur les trajectoires estimées à partir de l'ajustement (figure 25). L'amplitude d'un tel mouvement est beaucoup trop importante pour être due au mouvement thermique de l'ADN ou à la diffusion de l'enzyme. Il est très peu probable que ces sauts puissent être reliés au "croisement" de 2 NCs-EcoRV, puisque que quelques minutes séparaient en général deux interactions successives. Sur certains films, la diffusion du NC-EcoRV en solution pendant la phase de saut peut même être observée. La figure 26 présente la distribution de la distance séparant les sites connectés par un saut. Nous verrons dans la prochaine section que nous avons observé de nombreux sauts similaires dans les expériences où EcoRV est marquée avec la streptavidine-Cy3. Nous discuterons alors de la statistique de ces sauts, le nombre d'événements enregistrés étant beaucoup plus élevé. Le fait que nous puissions occasionnellement observer de tels sauts dans nos expériences suggère que ce

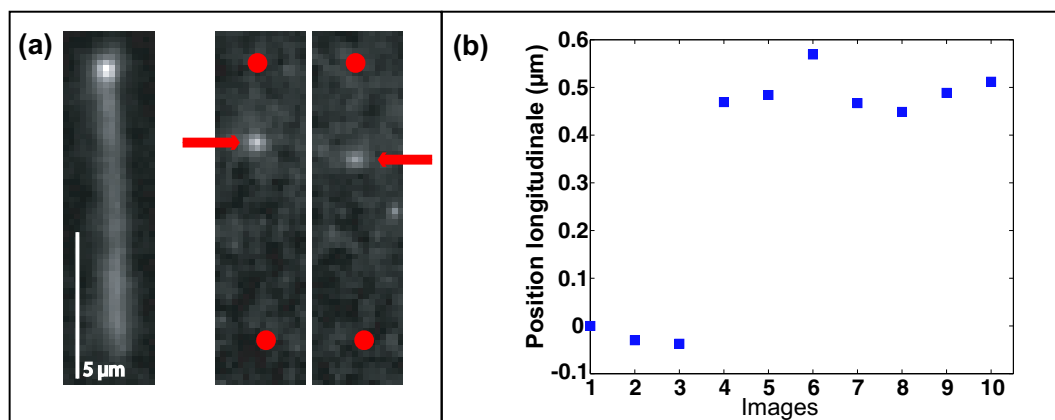


FIG. 25 – (a) Deux images consécutives d'un film illustrant le saut d'un NC-EcoRV (à gauche : image de la molécule d'ADN observée). (b) Position longitudinale du spot au voisinage du saut, calculée par le programme d'analyse ; les troisième et quatrième images sont celles montrées dans (a). Film réalisé à 25 mM NaCl, durée séparant deux images consécutives : 47 ms.

phénomène doit être très fréquent sur des molécules d'ADN en pelote, qui est la configuration habituelle des molécules d'ADN en solution.

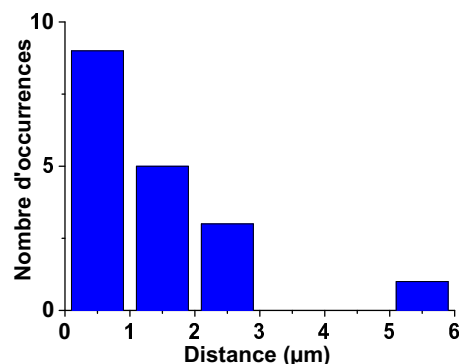


FIG. 26 – Distribution des distances séparant les sites avant et après les sauts (18 sauts observés sur l'ensemble des expériences réalisées).

Effet du couplage à un nanocrystal sur les caractéristiques de la diffusion d'EcoRV

Est-il possible de déduire des résultats obtenus pour les complexes NC-EcoRV des informations sur la diffusion facilitée de l'enzyme non couplée? Les effets dus au couplage d'EcoRV à un nanocrystal sont les suivants :

a) Effets stériques et électrostatiques : la gêne stérique liée à l'utilisation de NCs (de taille bien supérieure à celle d'EcoRV) est sans doute limitée par l'utilisation du mutant K58C. Celui-ci permet de former un complexe NC-EcoRV dont le ou les site(s) de liaison avec l'ADN

sont situés à la périphérie du complexe et sont donc bien accessibles. Pour limiter les effets électrostatiques, susceptibles de perturber l'interaction entre l'ADN et les enzymes, nous nous sommes placés à pH de 6,8, très proche du point isoélectrique de la streptavidine. A ce pH, il est probable que les NCs conjugués à la streptavidine sont peu chargés. Ils interagissent peu avec les espèces chargées comme l'ADN ou les protéines utilisées pour la passivation des surfaces, comme nous l'avons vérifié expérimentalement, ce qui n'est pas le cas à des pH différents.

b) Effet du ratio EcoRV/nanocristaux : afin d'enregistrer des événements d'association du complexe NC-EcoRV sur l'ADN avec une fréquence satisfaisante, de l'ordre d'un événement par minute, nous avons préparé ces complexes dans un ratio 1 :15 (1 NC pour 15 enzymes, un nanocristal possédant une dizaine de molécules de streptavidine sur sa surface). Si une dizaine de protéines couvre un nanocristal donné, une collision avec l'ADN permet en effet d'observer avec une probabilité élevée un événement analysable. Il n'est pas exclu dans nos expériences qu'un NC-EcoRV individuel ait la possibilité d'interagir simultanément avec l'ADN par l'intermédiaire de plusieurs enzymes. Afin de vérifier l'implication éventuelle d'un tel processus, nous avons mené des expériences de contrôle avec un ratio EcoRV/nanocristal de 2 environ, à 50 mM NaCl. A ce ratio, il est très improbable qu'un NC-EcoRV puisse interagir avec l'ADN par deux enzymes simultanément. Nous avons observé dans ces conditions une fréquence plus faible pour les événements d'interaction que dans l'expérience effectuée à un ratio de 15 enzymes/nanocristal dans le mélange initial. En revanche l'analyse quantitative des caractéristiques des événements d'interaction n'a pas révélé de variation significative des durées d'interactions et des coefficients de diffusion. Nous avons mesuré, à 50 mM NaCl, un temps d'interaction moyen d'environ 1 s (41 événements analysés) et un coefficient de diffusion de $5.0 \pm 4.4 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (4 événements analysés), résultats voisins de ceux obtenus avec un ratio de 15 enzymes/nanocristal (durée moyenne d'interaction de 0.8 s et coefficient de diffusion de $3.4 \pm 3.4 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$).

c) Effet de la présence d'un nanocristal sur la diffusion 3D et 1D d'EcoRV : la présence d'un nanocristal lié à EcoRV affecte sans doute la diffusion de cette enzyme le long des molécules d'ADN. En effet, la friction hydrodynamique qui s'exerce sur un NC-EcoRV est supérieure à celle qui s'exerce sur une enzyme nue. Le coefficient de diffusion sur l'ADN étant vraisemblablement régi, au moins en partie, par des paramètres hydrodynamiques [120], la diffusion d'un NC-EcoRV est donc probablement plus lente que celle d'une enzyme libre. Nous allons considérer deux cas extrêmes, correspondant au sliding pur et au hopping pur. Dans les deux cas, afin d'évaluer l'effet de la présence d'un nanocristal sur le coefficient de diffusion d'EcoRV, nous avons utilisé le modèle développé par Schurr [120] pour relier le coefficient de diffusion d'une protéine à sa taille. Ce modèle prend uniquement en compte la friction hydrodynamique qui s'exerce sur les protéines sans considérer d'éventuels frottements entre les protéines et l'ADN. Notons tout de suite que l'hypothèse d'un mouvement de sliding est appuyée par le fait expérimental que le coefficient de diffusion D mesuré ne dépend pas de la salinité de la solution. En effet, si on considère un mouvement de hopping, la protéine diffuse à 3D entre deux associations avec l'ADN. Le coefficient de diffusion 3D n'est pas modifié par la salinité de la solution, en revanche le temps de résidence de l'enzyme sur l'ADN lors d'une association élémentaire doit diminuer lorsque la salinité augmente. Le temps total passé par l'enzyme au cours de l'interaction devrait donc diminuer, ce qui se traduit par une augmentation du coefficient de diffusion 1D mesuré. Dans le mouvement de sliding, la salinité n'intervient pas dans l'expression du coefficient de diffusion, mais seulement dans le temps total passé au contact de l'ADN, donc finalement de

la longueur explorée lors d'une interaction, ce que nous avons constaté.

Nous appliquons le modèle de Schurr à la fois aux enzymes nues et aux complexes NC-EcoRV. Schurr propose d'écrire le coefficient de diffusion d'une protéine le long de l'ADN sous la forme $D = k_B T / f_{\text{eff}}$, où f_{eff} désigne le coefficient de friction d'une protéine de rayon hydrodynamique R_h . Ce coefficient de friction est donné par :

$$f_{\text{eff}} = 6\pi\eta R_h [1 + 4/3(2\pi)^2 (R_h/3.4 \text{ nm})^2], \quad (6)$$

où η est la viscosité de l'eau (10^{-3} Pas^{-1}) et où 3.4 nm est la longueur correspondant à un tour dans une double-hélice d'ADN. Le premier terme représente la friction associée à la composante translationnelle du mouvement, et le second traduit la friction causée par sa composante rotationnelle.

Dans le cas d'un mouvement de sliding, le mouvement de l'enzyme est une diffusion unidimensionnelle dans un mouvement hélicoïdal selon le grand sillon de l'ADN. Nous supposons que les protéines conservent la même orientation par rapport au double-brin d'ADN tout au long du mouvement. Pour des objets de rayon hydrodynamique supérieur au nanomètre, le terme de translation est négligeable devant le terme rotationnel :

$$f_{\text{eff}} \simeq 32\pi^3 \eta R_h^3 / (3.4 \text{ nm})^2.$$

Pour estimer le rayon hydrodynamique d'EcoRV, nous nous appuyons sur une étude de Arrio-Dupont et al., qui ont mesuré le rayon hydrodynamique de protéines globulaires de masses moléculaires variables [130]. Selon cette étude, une protéine de masse moléculaire 60 kD comme EcoRV a un rayon hydrodynamique de 6 à 7 nm. Par ailleurs, le rayon hydrodynamique de nanocristaux bioconjugués a été mesuré par diffusion de lumière [131, 132]. Pour des nanocristaux-streptavidine, il est de l'ordre de 15 nm. Le rayon hydrodynamique des nanocristaux-EcoRV a sans doute une valeur légèrement supérieure, qui dépend du nombre d'enzymes par nanocristal. Nous allons supposer que sa valeur est comprise entre 15 et 20 nm. Le rapport des rayons hydrodynamiques d'un NC-EcoRV et d'une enzyme a donc une valeur comprise entre 2 et 3. Comme on l'a vu, le coefficient de diffusion varie comme R_h^{-3} dans le modèle de Schurr. On attend donc pour une enzyme libre un coefficient de diffusion de 8 à 27 fois supérieur à celui d'un NC-EcoRV. A partir du coefficient de diffusion mesuré pour les nanocristaux-EcoRV, proche de $4 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, on attend donc un coefficient de diffusion D compris entre $3 \cdot 10^{-2}$ et $11 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ pour des enzymes nues. Afin d'estimer la longueur explorée sur l'ADN au cours d'un événement de sliding, nous allons supposer que les durées d'interaction avec l'ADN des nanocristaux-EcoRV sont les mêmes que celles des enzymes libres. Cette hypothèse semble raisonnable, car la durée de l'interaction dépend essentiellement de la force de la liaison non spécifique ADN-EcoRV. Sa validité devrait pouvoir être vérifiée ultérieurement grâce à l'utilisation d'enzymes marquées avec des fluorophores organiques de petite taille. Selon nos résultats expérimentaux, les NC-EcoRV explorent en moyenne 380 paires de bases au cours de leur mouvement sur l'ADN (à 25 mM NaCl). Cette distance explorée étant proportionnelle à \sqrt{D} , elle doit être multipliée par le rapport des rayons hydrodynamiques d'un NC-EcoRV et d'une enzyme élevé à la puissance 3/2. Ceci permet de prédire une exploration moyenne entre 1 à 2 kb par événement d'interaction à 25 mM NaCl. Ces valeurs sont en excellent accord avec celles estimées à l'aide d'expériences de biochimie, qui prédisent un sliding sur une longueur maximale d'environ 1 à 2 kb, dans des conditions proches des nôtres [121].

Dans le cas d'un mouvement de hopping, le terme rotationnel disparaît, puisque la protéine diffuse en solution entre deux interactions avec l'ADN. On attend donc pour une enzyme libre

un coefficient de diffusion de 2 à 3 fois supérieur à celui d'un NC-EcoRV. A partir du coefficient de diffusion mesuré pour les nanocristaux-EcoRV, proche de $4 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, on attend donc un coefficient de diffusion D compris entre $8 \cdot 10^{-3}$ et $12 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Il est plus difficile d'estimer la longueur explorée sur l'ADN dans ce cas, car elle correspondrait à un départ de l'enzyme d'une zone proche de l'ADN. Dans l'hypothèse où le temps d'interaction reste du même ordre de grandeur, la longueur explorée devrait rester de l'ordre de 300 à 500 bp, suivant la valeur de la salinité, donc plus petite que celle qui devrait être observée si le sliding est le mécanisme qui sous-tend la diffusion facilitée.

On conçoit donc qu'un paramètre important dans ces expériences soit la taille de l'enzyme qui diffuse le long de l'ADN. C'est pourquoi nous avons mis en place des expériences qui impliquent des enzymes marquées avec de la streptavidine-Cy3, dont la taille est comparable à celle de l'enzyme. La comparaison des coefficients de diffusion dans ces conditions devrait nous permettre de trancher entre les deux mécanismes, sous réserve que le modèle de Schurr soit adapté. Signalons qu'il existe d'autres modèles de diffusion qui pourraient compliquer l'analyse. Récemment, le sliding des protéines selon le grand sillon de l'ADN a été contesté [116]. L'enzyme pourrait par exemple glisser le long de l'ADN comme elle le ferait sur un cylindre, dans une diffusion 2D. Dans ce cas, le coefficient de diffusion de l'enzyme nue se situerait entre les deux valeurs déterminées en considérant le sliding seul ou le hopping seul.

Discussion de la distribution large des coefficients de diffusion

Les mesures du coefficient présentent une dispersion importante. Celle-ci est due en partie à notre procédure d'analyse, mais elle peut également avoir d'autres origines :

- Sur les trajectoires expérimentales des NC-EcoRV, nous pouvons occasionnellement discerner des sauts qui ont lieu sur des distances supérieures à l'amplitude des fluctuations longitudinales (figure 25). Aucun coefficient de diffusion n'est mesuré à partir de ces trajectoires. En revanche, les sauts sur une distance plus courte, égale ou inférieure à l'amplitude des fluctuations longitudinales, ne peuvent être détectés. Les trajectoires correspondantes ne sont donc pas exclues de l'analyse. Cela peut donc entraîner une surestimation de D .
- Les expériences ont été analysées en supposant une diffusion homogène des enzymes sur l'ensemble des molécules d'ADN. Cette hypothèse néglige tout effet lié à la séquence de l'ADN, qui pourrait moduler le paysage énergétique le long de l'ADN et donc provoquer des variations locales du coefficient de diffusion des enzymes. Une modélisation théorique de ces effets a été récemment proposée par Barbi et al. [133], et une observation expérimentale en a été réalisée par Yanagida [76]. De tels effets sont difficiles à prendre en compte dans nos expériences : une partie des molécules n'étant sans doute pas entières, il n'est pas possible de corréler la position des NC-EcoRV à la séquence d'ADN qui les entoure.

Comparaison de nos expériences avec d'autres expériences.

a) Concentration en sel optimale pour la localisation et le clivage des séquences-cibles par EcoRV : Jeltsch et Pingoud ont analysé l'effet de la concentration en sel et en magnésium sur l'efficacité relative de clivage par EcoRV de cibles insérées sur des molécules d'ADN de longueurs différentes [121]. A partir de ces expériences, ils ont prévu une longueur explorée par événement de sliding maximale à 50 mM NaCl, de l'ordre de 1 à 2 kb. A première vue, cet optimum à 50 mM NaCl est incompatible avec nos résultats. Nous avons en effet observé que la longueur explorée était maximale pour la plus faible des concentrations en sel testées (25 mM).

Cependant, une différence importante sépare ces deux expériences. En effet, dans l'expérience de Jeltsch et Pingoud, les concentrations en sel et en magnésium influent non seulement sur la diffusion d'EcoRV, mais aussi sur le processus de clivage de l'ADN (l'efficacité de ce processus décroît à faibles salinités). Leur expérience n'isole donc pas complètement l'effet de ces ions sur la diffusion des enzymes.

b) Coefficients de diffusions obtenus avec celui mesuré pour l'ARN polymérase : antérieurement à nos expériences, une étude menée dans le groupe de Yanagida a permis l'observation directe de la diffusion d'une enzyme le long de l'ADN [76]. Cette étude conclut à un coefficient de diffusion de l'ordre de $(700 \text{ pb})^2 \text{s}^{-1}$ pour l'ARN polymérase de E. Coli. Cette valeur est comprise entre celle que nous avons mesurée directement pour les NC-EcoRV à 25 mM NaCl ($(380 \text{ pb})^2 \text{s}^{-1}$) et celle que nous avons proposée pour les enzymes libres à partir du modèle de Schurr (de l'ordre de $(1000 \text{ pb})^2 \text{s}^{-1}$). Ces valeurs semblent compatibles. En effet, l'ARN polymérase de E. coli. a une masse moléculaire totale de 380 kD intermédiaire entre celle d'EcoRV (60 kD) et celle d'un nanocrystal. Il était donc prévisible que son rayon hydrodynamique, et donc son coefficient de diffusion le long de l'ADN, soient compris entre ceux d'EcoRV et ceux d'un NC-EcoRV.

c) Coefficient de diffusion de la recombinaison Rad51 : récemment, Eric Greene a observé la diffusion de la recombinaison Rad51 le long de molécules d'ADN étirées [134]. La technique utilisée pour étirer l'ADN est très proche de la méthode que nous avons développée. Les extrémités de molécules d'ADN du phage λ sont biotinylées puis accrochées à une surface sur laquelle de la neutravidine est déposée. Un flux hydrodynamique est utilisé pour étirer l'ADN. Les interactions non-spécifiques entre Rad51, marquée à l'AlexaFluor 555, et la surface sont évitées en déposant une bicouche lipidique sur la surface. Un coefficient de diffusion égal à $0,042 \pm 0,054 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ est mesuré. Ce coefficient est proche de celui que nous avons estimé pour une enzyme nue dans un modèle de sliding, la taille de Rad51 étant comparable à celle d'EcoRV. Un flux lors de l'expérience entraîne les enzymes à une extrémité de l'ADN, sur laquelle elles demeurent, ce qui apporte un argument supplémentaire aux partisans du sliding.

c) Coefficient de diffusion de l'enzyme de réparation hOgg1 : X. Sunney Xie a observé la diffusion de l'enzyme de réparation hOgg1 marquée Cy3B le long de molécules d'ADN étirées [87]. Dans cette expérience, l'ADN est accroché par une de ses extrémités (modifiée par incorporation de biotine) à une surface couverte d'un mélange PEG/PEG-biotine couvert de streptavidine. Le tapis dense de PEG apparaît comme une méthode efficace pour limiter les interactions non spécifiques entre protéines et surface. Le coefficient de l'enzyme a été mesuré pour différents pH, et varie de 0,01 (pH 6,6) à 0,6 (pH 7,8) $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Ces coefficients sont du même ordre de grandeur que ceux que nous avons prédit pour EcoRV nue dans un modèle de sliding, les deux protéines étant de tailles comparables. hOgg1 doit cependant posséder des propriétés particulières, comme l'attestent la dépendance en pH du coefficient de diffusion, dépendance qui n'est pas attendue pour EcoRV.

Si les premières expériences destinées à observer la diffusion facilitée d'enzymes marquées étaient qualitatives [135], les expériences évoquées ci-dessus montrent qu'il est également possible d'obtenir des résultats quantitatifs. Elles montrent également que l'étude de la diffusion d'enzymes différentes peut mettre en évidence des comportements différents. Les expériences que nous allons décrire maintenant permettent de caractériser la diffusion d'EcoRV marquée

avec un fluorophore plus petit que les NCS, en l'occurrence de la streptavidine marquée Cy3. Ces expériences sont destinées à établir la dépendance du coefficient de diffusion vis-à-vis de la taille du complexe en interaction avec l'ADN.

4.3 EcoRV marquée streptavidine-Cy3

Les NCs se sont révélés d'excellentes sondes fluorescentes dans les expériences présentées dans la section précédente. Néanmoins leur rayon hydrodynamique, plus grand que celui d'EcoRV, oblige à une analyse supplémentaire pour déduire de nos mesures le coefficient de diffusion de l'enzyme nue. Cette analyse repose sur un modèle hydrodynamique simple, qui reste discutable. Idéalement, l'enzyme devrait être marquée avec un fluorophore le plus petit possible, afin de modifier le moins possible sa dynamique. Nous envisageons très prochainement de marquer EcoRV directement avec un fluorophore organique, en collaboration avec W. Wende. Néanmoins, afin d'utiliser les enzymes biotinylées dont nous disposons, nous avons effectué une série d'expériences en couplant EcoRV à de la streptavidine-Cy3, dont le rayon hydrodynamique est approximativement celui d'EcoRV, les deux protéines globulaires ayant des masses molaires comparables. Nous avons de plus apporté des améliorations aux expériences précédentes. L'ADN utilisé est un fragment du phage T7, plus petit donc que l'ADN utilisé précédemment. Deux fragments PCR contenant des nucléotides-biotine ont été ligués aux extrémités du fragment. L'ADN a ensuite été étiré sur une surface couverte de streptavidine. Nous sommes parvenus à obtenir une densité élevée de streptavidine sur la surface par un traitement qui sera décrit brièvement. Cette densité est nécessaire à l'obtention d'un nombre correct de molécules d'ADN étirées, car il ne suffit pas qu'une extrémité de l'ADN se colle à la surface, il faut encore qu'après étirement hydrodynamique l'autre extrémité de la molécule "trouve" une streptavidine à la bonne position pour s'attacher. Les interactions non spécifiques entre protéines et surface ont été minimisées en utilisant de la caséine (Blocking Reagent, Roche). Ces expériences ont bénéficié de plus d'un progrès technique majeur, l'acquisition d'une caméra EMCCD (Andor) qui permet de détecter avec un temps d'exposition de 20 ms un colorant organique (en l'occurrence le Cy3) moins brillant que les NCs. Ces expériences ont été menées en microscopie par onde évanescente, l'épifluorescence ne permettant pas d'accéder à un rapport signal/bruit suffisant. Signalons que les surfaces couvertes de streptavidine génèrent un bruit de fond beaucoup plus faible que les surfaces couvertes de polystyrène. Ce dernier est en effet une source d'autofluorescence qui reste compatible avec l'utilisation de NCs, mais qui devient gênante lorsqu'un fluorophore organique individuel doit être détecté. Les résultats présentés brièvement dans cette section constituent une partie de ceux obtenus par Isabelle Bonnet lors de sa thèse, qui devrait être soutenue courant 2007.

Etirement d'ADN biotinylé sur des surfaces couvertes de streptavidine

Le principe consiste à accrocher des molécules d'ADN dont les extrémités ont été biotinylées sur des surfaces recouvertes de streptavidine. La liaison biotine-streptavidine, même si elle n'est pas covalente, est extrêmement forte (sa constante d'association est de 10^{15} M^{-1}) et assure un accrochage stable de l'ADN à la surface. La streptavidine peut être déposée sur les surfaces en la laissant s'adsorber non spécifiquement. Néanmoins, un tel traitement conduit à une densité souvent faible et en tous cas peu reproductible de streptavidine sur la surface, n'interdit pas l'adsorption non spécifique de l'ADN et surtout, ultérieurement, des protéines. Afin d'augmenter la densité de streptavidine sur la surface, celle-ci est déposée sur une lamelle au préalable recouverte d'aminosilanes (APTES) liés de manière covalente au verre. Cette surface est chargée

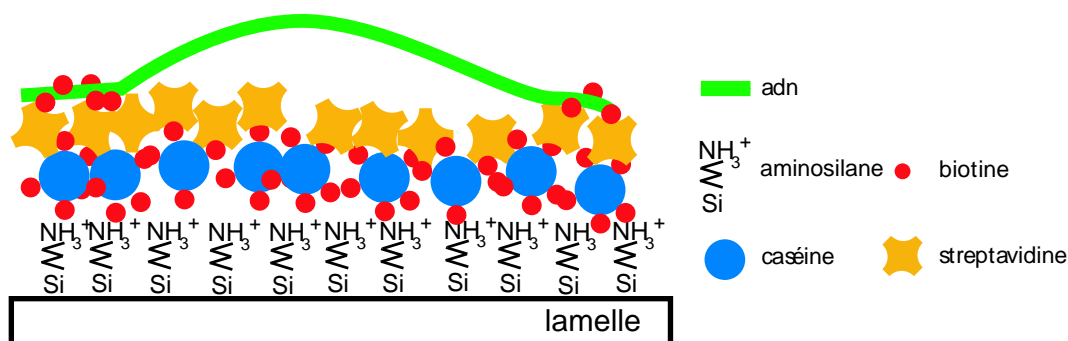


FIG. 27 – *Etirement d'ADN biotinylé. Les surfaces utilisés sont composées d'une couche d'aminosilanes, d'une couche de caséine biotinylée et d'une couche de streptavidine qui assure l'accrochage des molécules d'ADN biotinylées.*

positivement dans la gamme de pH utilisés, ce qui permet une adsorption massive et irréversible de caséine, dont le point isoélectrique est 4,7, donc chargée négativement (figure 27). Cette caséine a été au préalable biotinylée (incubation avec un NHS-ester biotine), permettant l'accrochage de la streptavidine, puis l'étirement de l'ADN de manière efficace comme l'ont montré nos expériences. Conformément aux prédictions du modèle décrivant les fluctuations de l'ADN étiré, les fluctuations transverses des molécules d'ADN utilisées (entre 5 et 10 kilobases), étirées à 75% environ, peuvent difficilement être distinguées sur les films réalisés. En effet leur amplitude est inférieure à 100 nm (donc à la résolution optique) et leur temps de corrélation (de l'ordre de la ms) est plus court que le temps d'exposition. Les molécules d'ADN sont marquées au SYBR Gold, et leur photodestruction conduit comme précédemment à la rétraction des deux fragments aux extrémités de la molécule, attestant d'un accrochage spécifique des extrémités. Grâce à la grande stabilité du lien biotine-streptavidine, aucun décrochage des molécules étirées n'est observé après augmentation du pH, ajout de sel ou ajout de caséine. De plus, nous avons constaté que la distribution des longueurs des molécules étirées est nettement moins large que sur les surfaces de polystyrène.

Nous avons tenté de marquer les extrémités de l'ADN étiré avec des NCs, en incorporant aux fragments PCR des nucléotides-DIG ou des nucléotides-fluorescéine. Notre but était de révéler la présence d'ADN étiré en repérant des paires de NCs (couvert d'anti-DIG ou d'antifluorescéine) correctement espacées et orientées, donc sans utiliser de ligand fluorescent du sillon de l'ADN. Ces expériences, qui sont poursuivies par Emilie Mercey, actuellement en stage post-doctoral au laboratoire, n'ont malheureusement pas donné les résultats escomptés. Les résultats présentés dans le paragraphe suivant ont donc été obtenus avec de l'ADN détecté grâce au SyBr.

Substrat ADN et marquage des enzymes

L'ADN utilisé est un fragment du phage T7, de longueur 8,2 kb. A ce fragment sont liguées deux fragments PCR de longueur 0,5 kb, dans lesquels ont été incorporés des nucléotides-biotine afin de permettre l'accrochage à la surface. La longueur totale de l'ADN étiré est donc égale à 9,2 kb, soit à peu près 1/5 de la longueur du phage λ précédemment utilisé. L'utilisation d'un fragment d'ADN plus court permet de réduire l'amplitude des fluctuations transverses et longitudinales, et de diminuer leur temps de corrélation caractéristiques. Plus précisément,

l'amplitude des fluctuations est réduite de $\sqrt{5}$, et le temps de corrélation d'un facteur 25, ce dernier est donc maintenant de l'ordre de la ms, très inférieur au temps d'exposition (20 ms).

Pour marquer EcoRV, l'enzyme biotinylée donnée par W. Wende a été mélangée dans un rapport 1 :1 avec de la streptavidine-Cy3 (Amersham).

Résultats

La procédure expérimentale est très proche de celle qui a été suivie dans les expériences menées avec les complexes NC-EcoRV. Les enzymes marquées sont introduites dans une cavité à écoulement, à une concentration de l'ordre de 0,5 nM, après que l'ADN a été étiré. La concentration en NaCl dans toutes les expériences menées jusqu'à présent est égale à 25 mM. Les événements d'association et de diffusion le long de l'ADN ont été enregistrés et analysés suivant une procédure identique à celle décrite précédemment.

Il est plus difficile d'estimer le temps d'interaction des protéines marquées avec l'ADN. En effet, lorsque l'enzyme n'apparaît plus sur les films enregistrés, soit elle s'est détachée de l'ADN, soit le fluorophore a été photodétruit. Il resterait à estimer le temps moyen de photodestruction pour pouvoir conclure quant aux temps enregistrés d'interaction.

Sur les centaines d'évènements enregistrés, seuls 62 films permettent d'estimer un coefficient de diffusion (trajectoire assez longue, signal/bruit suffisant). Le coefficient de diffusion pour les enzymes a été estimé sur ces films, à partir de la MSD calculée sur les trajectoires des fluorophores. Nous avons trouvé $D = 1,1 \pm 0,7 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. La distribution de ces coefficients de diffusion est donnée sur la figure (28). Cette distribution est moins large que celle obtenue avec les complexes NC-EcoRV.

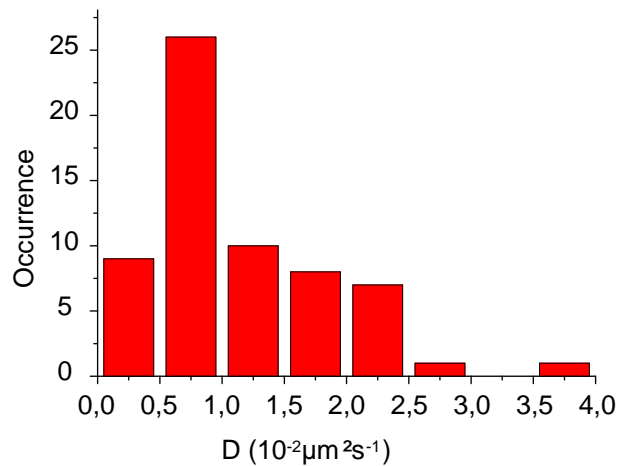


FIG. 28 – Distribution des coefficients de diffusion de l'enzyme de restriction EcoRV marquée streptavidine-Cy3 sur un fragment d'ADN du phage T7 étiré.

Nous avons également regroupé nos données pour ne tracer qu'une seule MSD prenant en compte tous les événements de diffusion. Cette procédure consiste à mettre "bout à bout" toutes les trajectoires et donne en général de très bons résultats même lorsque les trajectoires individuelles sont trop courtes pour donner une MSD satisfaisante. La figure (29) présente nos résultats pour les mouvements transverse et longitudinal de l'enzyme. La MSD suivant la direction

transverse est constante, comme le prévoit l'analyse d'un mouvement confiné, alors que la MSD longitudinale dépend linéairement du temps, et donne comme coefficient de diffusion pour les données regroupées $D = 0,017 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

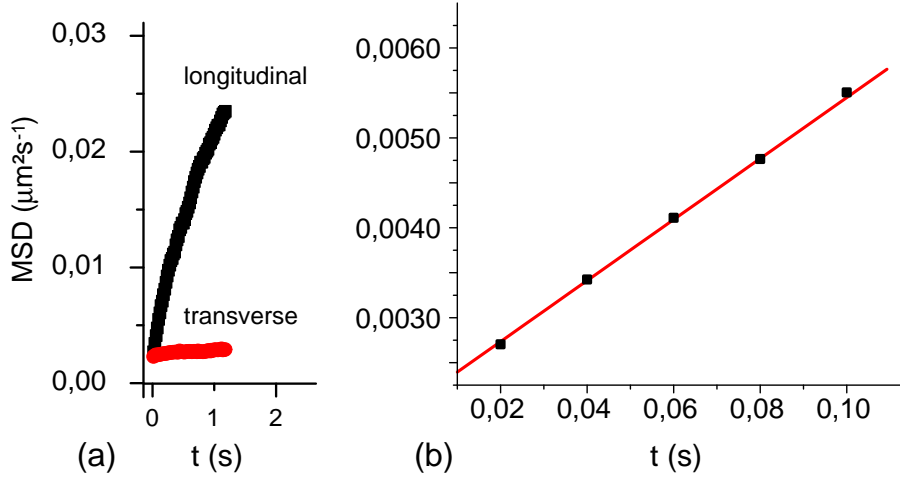


FIG. 29 – MSD des données regroupées. (a) La MSD suivant la direction transverse est constante, le mouvement étant confiné, alors que la MSD suivant la direction de l'ADN dépend linéairement du temps, le mouvement étant diffusif. (b) Ajustement des premiers points de la MSD longitudinale. Le coefficient de diffusion obtenu est $D = 0,017 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

La comparaison de ces valeurs pour le coefficient de diffusion D avec celles obtenues pour les complexes NC-EcoRV joue beaucoup en faveur du sliding comme processus élémentaire à l'origine de la diffusion facilitée. En effet le rapport des deux coefficients de diffusion moyen est de l'ordre de 5 à 10, alors que le rapport des tailles des complexes NC-EcoRV et EcoRV-streptavidine-Cy3 est de l'ordre de 1,5 à 2. Un mouvement hélicoïdal entraînant une dépendance en $1/\text{taille}^3$ du coefficient de diffusion est donc beaucoup plus probable qu'un mouvement de diffusion 3D entre deux associations qui entraînerait une dépendance en $1/\text{taille}$ de D .

4.3.1 Observation de sauts sur l'ADN

Comme dans le cas de l'étude de la diffusion des complexes NC-EcoRV, nous avons observé des sauts de l'enzyme marquée streptavidine-Cy3 le long de l'ADN étiré. Ces sauts interviennent en général entre deux phases de diffusion plus ou moins longues (figure 30). Leur nombre est relativement important puisque, sur la centaine de films enregistrés, nous avons pu identifier plus d'une vingtaine de sauts dont la longueur est supérieure à $0,3 \mu\text{m}$.

Afin d'identifier ces sauts de manière systématique, nous avons tracé la distribution des différences de position $dy = y(i+1) - y(i)$, où $y(i)$ est la position suivant l'ADN de la protéine, pour le fichier regroupant nos données (figure 31(a)). La distribution obtenue est ajustée de manière satisfaisante par une gaussienne, en tous cas pour les différences dy inférieures à la largeur σ de cette gaussienne. Cette largeur est de l'ordre de 80 nm, et inclut la précision de pointé du fluorophore (de l'ordre de 20 nm), l'amplitude des fluctuations transverses de l'ADN (de l'ordre de 50 nm) et le mouvement diffusif de l'enzyme, qui en moyenne explore durant le temps d'exposition $dt = 20\text{ms}$ la distance $d = \sqrt{2Ddt}$, soit environ 30 nm pour un coefficient de diffusion

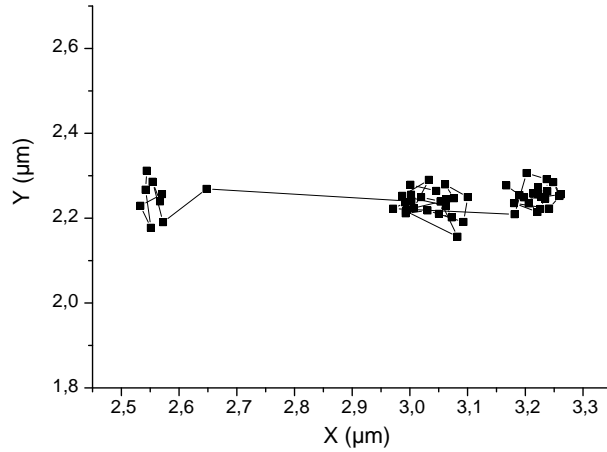


FIG. 30 – Trajectoire d'une enzyme le long de l'ADN étiré. Un saut dont la longueur est de l'ordre de 500 nm apparaît entre deux mouvements diffusifs.

de $2 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

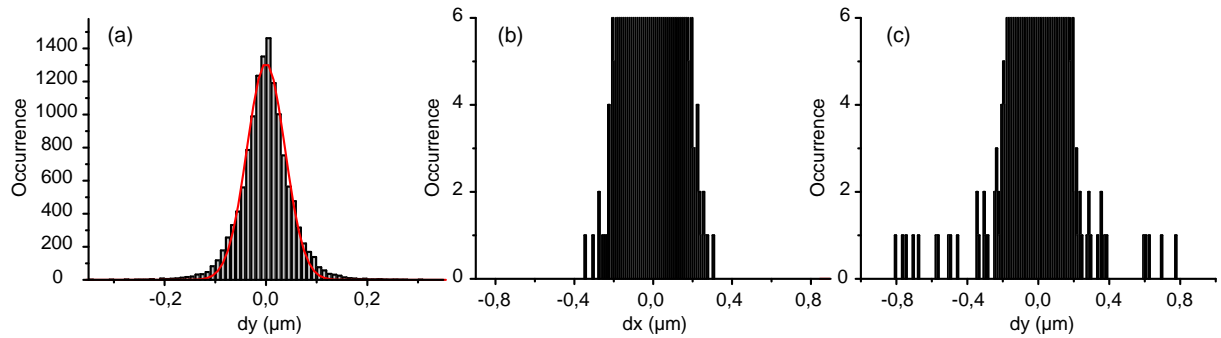


FIG. 31 – (a) Distribution des différences de position de l'enzyme dans son mouvement de diffusion le long de l'ADN. (b) Agrandissement des ailes de la distribution des différences de position transverse de l'enzyme. (c) Agrandissement des ailes de la distribution des différences de position longitudinale de l'enzyme.

Les sauts éventuels se situent dans les ailes de cette distribution (figure 31(c)). Ces ailes peuvent par exemple être comparées à celles de la distribution des différences de position $dx = x(i+1) - x(i)$ (figure 31(b)). Cette distribution a elle aussi une largeur σ de l'ordre de 80 nm, valeur liée à l'amplitude des fluctuations transverses de l'ADN et à la précision de pointé de la protéine. Au-dessus de 4σ (soit $0,32 \mu\text{m}$), un seul évènement est visible sur la distribution de dx (la distribution des vitesses contenant environ $N_{\text{tot}} = 1,3 \cdot 10^4$ points, le nombre d'évènements attendus au-dessus de 4σ est d'ailleurs de l'ordre de $2 \text{Nerf}(4/\sqrt{2}) \simeq 1,56$). Les 23 évènements que nous avons détectés au-dessus de $4\sigma = 0,3 \mu\text{m}$ pour la distribution de dy (figure 31(c)) correspondent donc très probablement à des sauts macroscopiques que le mouvement Brownien 1D ne peut expliquer.

L'analyse de la distribution des longueurs de ces sauts est en cours, elle fait l'objet d'une collaboration avec Olivier Bénichou et Raphaël Voituriez (LPTMC, Université Pierre et Marie

Curie, Paris). Cette analyse nous semble très importante. D'une part, à notre connaissance, l'existence de sauts de cette taille le long de l'ADN n'a jamais été rapportée, et pourrait témoigner d'un mécanisme de diffusion facilitée inédit. En effet, la probabilité pour qu'une enzyme retrouve l'ADN étiré après s'être détachée et avoir effectué une diffusion 3D sur plusieurs centaines de nanomètres est très faible. Nous espérons pouvoir également déduire de cette analyse le rôle joué par les "petits" sauts, c'est-à-dire les sauts que nous ne pouvons détecter, et leur part dans la diffusion facilitée à courte distance.

Nous donnons ici les premiers éléments de cette analyse, menée à partir d'une cumulative $P(y) = NC(y)$ définie comme le produit de la probabilité $C(y)$ d'observer un saut de longueur supérieure à y par le nombre de sauts observés N . Cette fonction n'est définie qu'en certains points, correspondant aux différentes valeurs de longueurs de saut relevées. Plus précisément, si les longueurs des sauts sont classées sous forme d'une suite y_1, y_2, \dots, y_N , alors la fonction est définie en ces points par $P(y_1) = N, P(y_2) = N_0 - 1, \dots, P(y_N) = 1$. Cette fonction est représentée sur la figure (32).

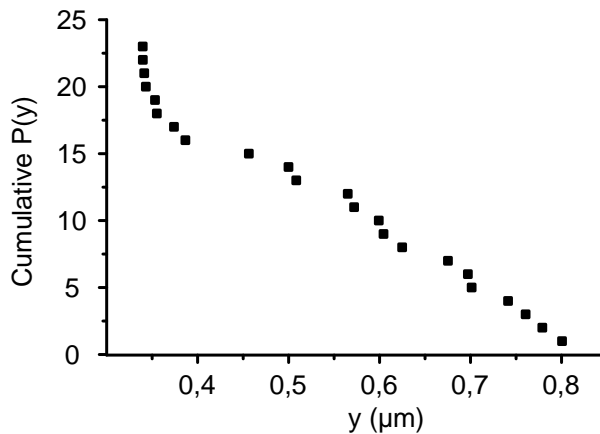


FIG. 32 – Cumulative $P(y)$ des sauts de longueurs supérieures à y , pour $y > 0,31 \mu\text{m}$.

Par ailleurs, la forme analytique de cette cumulative $P(y)$ peut être estimée en considérant des modèles de sauts. On modélise pour cela l'ADN par un cylindre infini, de rayon a , et on considère que la protéine part d'un point de coordonnées cylindriques $(r_0, y = 0)$ (r_0 peut être voisin de a , mais il faut le prendre différent de a , sinon la protéine revient infiniment vite sur l'ADN). La protéine diffuse à 3D puis revient s'adsorber sur l'ADN en un point (a, y) . Il est possible d'estimer la probabilité $p(y)$ d'un saut de longueur y en se ramenant à un problème d'électrostatique ; cette probabilité s'identifie en effet au champ électrostatique créé par une charge placée en $(r_0, 0)$ au point (a, y) d'un cylindre infini à potentiel nul. La solution exacte du problème est difficile à utiliser, on peut cependant en donner une expression simplifiée lorsque $y \gg (r_0 - a)$ dans deux cas que nous allons examiner : une diffusion libre 3D entre deux associations à l'ADN et un mouvement de diffusion 3D confiné au voisinage de l'ADN.

Dans le cas d'une diffusion 3D libre entre deux associations à l'ADN, la probabilité $p(y)$ est de la forme :

$$p(y) = \frac{1}{\lambda} \frac{\ln(y_1/\lambda)}{(y/\lambda) \ln^2(y/\lambda)},$$

où λ est un paramètre dont l'interprétation physique resterait à trouver. La cumulative $P(y)$

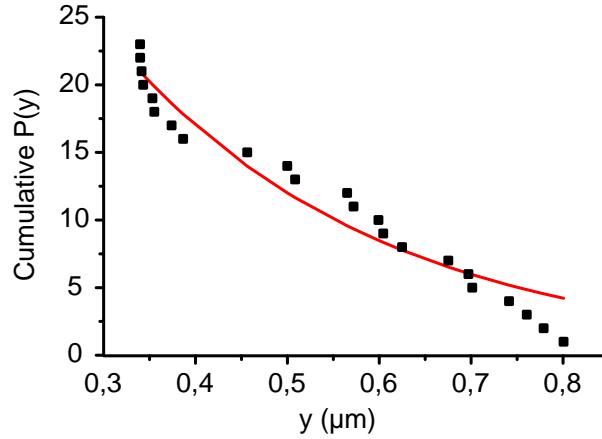


FIG. 33 – Cumulative $P(y)$ des sauts de longueurs supérieures à y ajustée par une exponentielle décroissante $N \exp(-y/\lambda)$. La valeur $N_0 = 69$ est la valeur expérimentale, et $\lambda = 0,29 \mu\text{m}$ est donnée par l'ajustement à un paramètre.

associée est donnée par :

$$P(y) = N \frac{\ln(y_1/\lambda)}{\ln(y/\lambda)}.$$

Cette cumulative n'est pas compatible avec nos données expérimentales, quelle que soit la valeur du paramètre λ . Il semble donc qu'il nous faille ajouter des hypothèses supplémentaires.

Dans le cas d'un mouvement de diffusion confinée au voisinage de l'ADN durant la diffusion 3D, la distribution $p(y)$ est asymptotiquement exponentielle :

$$p(y) = \frac{1}{\lambda} e^{-y/\lambda},$$

l'interprétation du paramètre λ étant cette fois plus simple, puisqu'il s'agit de la longueur moyenne d'un saut. Dans ce cas, la cumulative $P(y)$ s'écrit :

$$P(y) = N_0 e^{-y/\lambda},$$

où N_0 est le nombre total de sauts durant l'ensemble des événements d'association analysés (une centaine). L'hypothèse est faite dans cette expression que la loi asymptotique exponentielle est valable pour les "petits" sauts, ce qui est sûrement discutable. L'ajustement de nos données avec une telle loi est assez satisfaisant (figure 33) et fournit comme longueur moyenne de saut $\lambda = 0,29 \mu\text{m}$, soit environ 600 bp (l'ADN est étiré à 75 %). Si le sliding s'opère sur 600 bp environ, un saut moyen permettrait à l'enzyme d'explorer des zones pratiquement disjointes de l'ADN, optimisant la stratégie de recherche. L'ajustement fournit $N_0 \simeq 69$. En définitive, suivant ce modèle, un saut au plus se produirait lors de chaque événement, ce qui privilégierait beaucoup le sliding par rapport au hopping/jumping. Les sauts distribués de manière exponentielle optimiseraient la stratégie de recherche en permettant l'exploration de zones presque disjointes.

La figure (32) pourrait, pour $y > 0,4$, être ajustée de manière satisfaisante pas une droite. Un modèle simple permet de comprendre une telle distribution de sauts. Supposons qu'après dissociation de l'ADN, la diffusion 3D de la protéine s'effectue dans un "tunnel" de potentiel autour de l'ADN, tunnel électrostatique pas exemple. Le coefficient de diffusion à 3D est de trois ordres

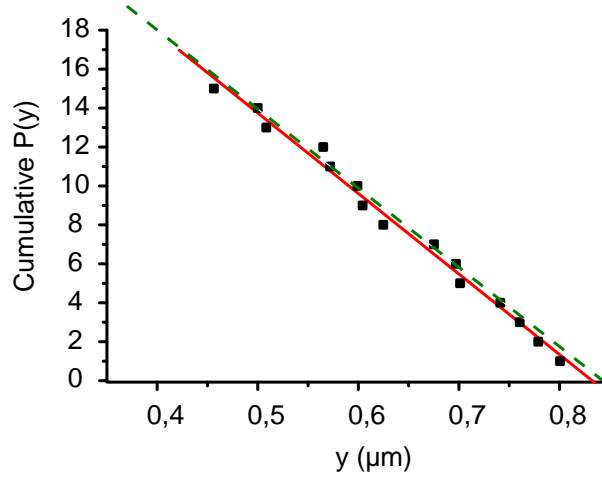


FIG. 34 – Cumulative $P(y)$ des sauts de longueurs supérieures à y ajustée par une droite d'équation $P(y) = 34,4 - 41,3y$ (en trait plein). En pointillés, la droite obtenue à partir d'un modèle simple $P(y) = 33 - 39y$.

de grandeur supérieur au coefficient de diffusion 1D, si bien qu'en 20 ms (temps d'exposition) la protéine diffuserait le long de l'ADN sur une distance de l'ordre de $1 \mu\text{m}$, soit précisément la valeur du plus grand saut observé. Remarquons que des sauts plus grands entraînent la protéine en dehors de l'ADN étiré, la longueur de ce dernier étant de $2,25 \mu\text{m}$. Si durant cette diffusion la protéine se réassocie à l'ADN de manière uniforme, la probabilité $p(y)$ est simplement de la forme $p(y) = 2/\lambda$, où λ est la longueur de l'ADN étiré (ce modèle suppose que le saut s'effectue à partir du milieu de l'ADN, d'où le facteur 2 qui traduit le fait que la longueur maximale d'un saut est alors $\lambda/2$). La cumulative $P(y)$ est donnée par :

$$P(y) = N_0(1 - 2y/\lambda) = N \frac{1 - 2y/\lambda}{1 - 2y_1/\lambda},$$

où $(y_1; P(y_1))$ est un point expérimental. On peut affiner ce modèle en considérant tous les points de départ possibles de l'ADN pour un saut. Un calcul non détaillé ici montre que la probabilité $p(y)$ est alors de la forme $p(y) = 8/3\lambda$, si bien que :

$$P(y) = N_0(1 - 8y/3\lambda) = N \frac{1 - 8y/3\lambda}{1 - 8y_1/3\lambda},$$

où $N_0 = N/(1 - 8y_1/3\lambda)$ est le seul paramètre à déterminer. A partir du point $y_1 = 0,5; P(y_1) = N = 14$, on trouve $N_0 \simeq 33$. La pente p est alors $p = -2N_0/\lambda$ soit $p \simeq -39 \mu\text{m}^{-1}$, valeur remarquablement proche de celle obtenue à partir d'un ajustement linéaire des points tels que $y > 0,46$ (figure (34)). Dans ce modèle également, les sauts permettent une optimisation de la stratégie de recherche. Il resterait à mener des expériences sur de l'ADN plus long pour valider ce modèle de tunnel électrostatique par l'observation de sauts dont la longueur maximale serait proportionnel à celle de l'ADN étiré.

5 Conclusion et perspectives

5.1 Conclusions

L'étude des interactions entre protéines et ADN a été le centre de mon travail de recherche au cours des dernières années, au sein de l'équipe "Optique et Biologie" du laboratoire Kastler Brossel. Nous nous sommes concentrés sur un problème de biologie qui a fait l'objet de nombreuses études menées par des biochimistes au cours des dernières années, la recherche par les enzymes site-spécifiques de leur cible sur l'ADN. En utilisant des méthodes optiques, nous avons observé la diffusion facilitée de l'enzyme de restriction EcoRV sur de l'ADN étiré à l'échelle de la molécule individuelle. Ces expériences ont pu être menées grâce à une collaboration avec W. Wende, un biochimiste allemand du groupe d'A. Pingoud (Université de Giessen). Nous avons auparavant mis au point une technique qui nous permet d'accrocher spécifiquement par leurs extrémités des molécules d'ADN étirées à une surface, nous permettant l'utilisation de la microscopie en onde évanescente. Les nanocristaux semiconducteurs, dont nous avons étudié les propriétés photophysiques, nous ont permis de suivre la trajectoire d'enzymes marquées le long de l'ADN. Nous avons déduit de nos observations les caractéristiques essentielles de la diffusion facilitée, en particulier le coefficient de diffusion 1D de l'enzyme. Ces expériences ont été répétées avec des enzymes marquées streptavidine-Cy3, ce qui nous a permis de comparer les coefficients de diffusion de deux complexes de tailles différentes. Nos observations tendent à prouver que le sliding, un glissement hélicoïdal de l'enzyme le long d'un sillon de l'ADN, est le mécanisme qui sous-tend la diffusion facilitée de l'enzyme et donc sa recherche de cible. Cette diffusion interviendrait sur des longueurs de l'ordre de quelques centaines de kb. Néanmoins, nous avons observé des sauts de grandes longueurs, qui pourraient permettre à l'enzyme d'explorer des zones disjointes de l'ADN lors de sa recherche de cible. La fréquence élevée de ces sauts lors d'une interaction avec l'ADN, observée en étudiant des enzymes marquées avec des nanocristaux, a été confirmée par l'utilisation d'enzymes marquées à l'aide streptavidine-Cy3. La combinaison de ces sauts et du sliding permettrait à l'enzyme de restriction de trouver sa cible avec une efficacité optimale, nécessaire à la survie des bactéries lors d'une attaque virale. Le mécanisme qui régit la distribution observée des sauts reste à préciser, nous avons cependant proposé dans ce mémoire un processus de diffusion 3D rapide au voisinage de l'ADN qui permet de rendre compte des résultats expérimentaux. Nous envisageons de répéter ces expériences avec des enzymes marquées directement par un fluorophore organique. Le coefficient de diffusion obtenu devrait être plus grand que ceux issus des expériences précédentes, la taille de la protéine directement marquée étant notamment inférieure de moitié à celle du complexe enzyme-streptavidine-Cy3. Sa valeur devrait fournir des indications supplémentaires sur le mouvement de l'enzyme. Si ce dernier est hélicoïdal, nous attendons en effet un coefficient presque un ordre de grandeur plus grand que celui déduit des expériences impliquant EcoRV-streptavidine-Cy3. Enfin, nous avons récemment mis en place une collaboration avec des théoriciens (O. Bénichou et R. Voituriez, LPTMC UPMC, Paris) afin de proposer un modèle de diffusion facilitée qui rende compte de nos résultats expérimentaux, les modèles stochastiques développés par cette équipe permettant d'introduire des sauts lors de la diffusion.

En parallèle à ces expériences sur ADN étiré, nous avons mené en collaboration avec Christophe Escudé (MNHN, Paris) des expériences sur ADN peigné. Nous sommes en particulier parvenus à détecter à l'échelle de la molécule individuelle et en microscopie de fluorescence une très courte séquence d'ADN (15 bp). Ce résultat a été obtenu en utilisant une triple hélice d'ADN. L'oligonucléotide reconnaissant la séquence d'intérêt forme dans ces expériences une boucle au-

tour de l'ADN, à laquelle est ensuite attaché un court fragment d'ADN contenant des nucléotides fluorescents. Nous avons également mis au point une méthode qui permet de détecter en microscopie de fluorescence de l'ADN peigné sans utiliser d'intercalants ou de ligands du sillon de l'ADN. Notre méthode repose sur l'utilisation de nanocristaux capables de reconnaître les extrémités de l'ADN peigné. Cette technique permet avec une grande efficacité (96 %) de détecter des molécules peignées, en repérant des paires de nanocristaux dans la direction de peignage, et séparées de la distance attendue pour les molécules d'ADN considérées.

5.2 Perspectives

Diffusion facilitée de la MéthylTransférase MTaqI

Nous allons mener dans les mois qui viennent des expériences similaires aux expériences de dynamique sur ADN étiré avec une autre enzyme, la DNA méthylTransférase MTaqI. Cette enzyme appartient au système de restriction-méthylation de la bactérie *Thermus aquaticus*, et protège l'ADN de l'action de ses propres enzymes de restriction en méthylant les adénines des sites de coupures. En pratique, cette enzyme catalyse le transfert d'un groupement méthyl d'un cofacteur S-adenosyl-L-méthionine vers la position en N6 de l'adénine présente dans la séquence 5'-TCGA-3'. Les méthyl-transférases jouent également un rôle important dans la régulation de l'expression génique. Nous avons obtenus MTaqI grâce à une collaboration avec un biochimiste allemand, Elmar Weinhold (Aachen). Ce dernier a développé une technique de marquage site-spécifique de l'ADN à l'aide de méthylases. En modifiant le cofacteur S-adenosyl-L-méthionine, E. Weinhold est parvenu à marquer spécifiquement la séquence cible de MTaqI avec d'autres groupements, la technique portant le nom de SMILing-DNA [136]. L'enzyme avec laquelle nous avons effectué quelques essais est déjà marquée avec un fluorophore organique, Cy3B. Le marquage n'est cependant pas optimal, puisque le colorant a été placé dans une zone proche du site de liaison avec l'ADN. Nous envisageons dans les prochains mois un marquage de la protéine en C-terminal, avec l'aide de E. Weinhold, Le mécanisme qui permet à une méthyltransférase de trouver sa cible n'a pas fait l'objet d'études particulières, contrairement au cas des enzymes de restriction. Nous abordons donc un sujet ouvert, avec cependant des outils qui devraient nous permettre de caractériser la dynamique d'interaction de l'enzyme avec l'ADN.

Pinces optiques et diffusion facilitée

En parallèle, nous développons un nouveau montage combinant pinces optiques et microscopie de fluorescence (Fig. 35). Une double pince optique nous permettra de positionner et d'étirer les molécules d'ADN, et la microscopie de détecter des enzymes individuelles marquées en interaction avec l'ADN. La combinaison de ces deux techniques présente des difficultés expérimentales importantes. Par exemple, la taille micrométrique des billes diélectriques destinées à tenir l'ADN n'est pas compatible avec l'utilisation de la microscopie par onde évanescente, puisqu'il est difficile d'approcher l'ADN de la surface à une distance de l'ordre de la centaine de nanomètres. Une autre difficulté provient de la puissance lumineuse nécessaire à piéger ces mêmes billes, 15 ordres de grandeur supérieure à celle issue d'un fluorophore. Même si la lumière des pinces est dans l'IR, et celle émise par un fluorophore dans le visible, la lumière diffusée par les billes doit être soigneusement filtrée. Cette même lumière peut être responsable du photoblanchiment rapide des fluorophores utilisés pour détecter la protéine, par des processus d'absorption à deux photons. L'utilisation de NCs comme sondes fluorescentes nous permettra de détecter en épifluorescence

des enzymes marquée interagissant avec l'ADN sans craindre la photoblanchiment. Ce montage expérimental présente de plus d'importants avantages par rapport au système qui repose sur l'ADN étiré au voisinage d'une surface. Les interactions non spécifiques des protéines avec la surface sont en particulier plus faciles à gérer, car les enzymes marquées éventuellement collées à la surface génèrent un signal de fluorescence hors zone de focalisation. La tension appliquée à l'ADN pourra également être ajustée, ce qui fournit un paramètre supplémentaire à nos expériences. L'amplitude des fluctuations longitudinales et transverses de l'ADN ainsi que les temps de corrélations associés, liés à cette tension, pourront être contrôlés. Nous envisageons sur ce montage expérimental de mener des expériences sur la diffusion facilitées des enzymes de restriction et les méthyltransférases. Le rôle de la tension de l'ADN pourra en particulier être abordé. L'influence de la tension sur les paramètres de la diffusion facilitée (coefficient de diffusion, temps d'interaction, longueur explorée) sera examinée.

Une séquence-cible pour EcoRV sera ensuite insérée sur l'ADN. L'influence de la tension de l'ADN sur la coupure par EcoRV sera considérée, la liaison de la protéine à sa cible induisant en effet une torsion de l'ADN qui dépend de sa tension [137]. Notre montage nous permettra de plus de visualiser les 4 étapes de l'activité enzymatique : la diffusion facilitée (enzyme en mouvement le long de l'ADN), la liaison à la séquence-cible (enzyme à l'arrêt), le départ de l'enzyme de sa cible et la coupure de l'ADN (la tension entre les billes se relâche). Il nous sera donc possible de différencier la liaison à la séquence cible de la coupure de l'ADN, distinction impossible dans les expériences d'ensemble. Nous aborderons alors la problématique dite de "premier passage", essentielle dans les problèmes de diffusion facilitée. Le sliding permet en effet un examen approfondi, paire de bases par paire de bases, de l'ADN et devrait conduire à une coupure de l'ADN dès le premier passage. Au contraire, plusieurs passages au voisinage de la séquence cible sont nécessaires si les processus de hopping/jumping sont essentiels, même si des très petits sauts (quelques bp) sont impliqués. Des expériences similaires sont envisageables avec MtaqI, après insertion d'une séquence-cible dans l'ADN. L'insertion par l'enzyme d'un groupement chimique à partir d'un cofacteur S-adenosyl-L-méthionine modifié induit en effet une liaison irréversible à l'ADN. Il sera donc possible de déterminer si l'enzyme modifie l'ADN au cours du premier passage ou non.

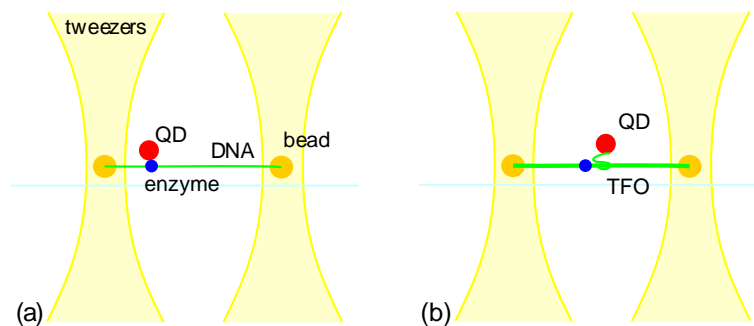


FIG. 35 – (a) Double pince optique permettant de positionner et d'étirer une molécule d'ADN. Une enzyme marquée par un nanocristal peut diffuser le long de l'ADN. (b) Un Oligonucléotide Cadenas formant un anneau autour de l'ADN permet l'étude de la dynamique d'une enzyme processive. L'oligonucléotide est marqué par un nanocristal, l'enzyme n'est pas marquée.

Oligonucléotides cadenas et enzymes processives

En collaboration avec C. Escudé, nous pensons utiliser des “Oligonucléotides Cadenas” (OC) fluorescents pour caractériser le mouvement d’enzymes processives (Fig. 35). Ces OC seront formés sur l’ADN étiré à partir d’une triple hélice se refermant sur elle-même. Un court fragment d’ADN contenant des nucléotides modifiés -par exemple des nucléotides-biotine- sera alors ligué à l’anneau formé. En couplant ce fragment à des NCs couverts de streptavidine, l’OC peut être localisé par microscopie de fluorescence. L’anneau ainsi formé peut être fermement attaché à la séquence-cible de la triple hélice, et interférer avec l’activité enzymatique, que ce soit la coupure par une enzyme de restriction [138] ou la transcription par une ARN polymérase [139]. Il est également possible de détacher l’anneau de sa séquence cible, et de restaurer l’activité des enzymes [138, 139]. D’après ces expériences, il est probable qu’une polymérase soit capable de pousser l’anneau le long de l’ADN durant la transcription. Le mouvement d’une enzyme processive pourrait ainsi être déduit du mouvement de l’anneau. Il resterait à estimer la force nécessaire au coulisement de l’OC, qui pourra être estimée expérimentalement, par exemple, à partir de ses fluctuations Browniennes de position le long de l’ADN en l’absence d’enzyme. Les informations obtenues pourraient d’ailleurs permettre de comprendre la dynamique des protéines qui, sous forme de multimères, forment des anneaux autour de l’ADN.

Cette approche nouvelle permet de caractériser la dynamique de l’enzyme sans marquer ni l’ADN, ni la protéine. L’absence de marquage permet de se libérer du doute qui subsiste souvent sur l’influence que peuvent avoir les fluorophores sur la dynamique de l’interaction ADN/protéines dans les expériences menées en microscopie de fluorescence. D’autres expériences pourraient être menées sur différentes classes d’enzymes interagissant avec l’ADN. La famille des enzymes de restriction de type I fournit en particulier des candidats intéressants. Le site de reconnaissance de ces enzymes est différent du site de restriction, et les enzymes “transloquent” l’ADN (c’est-à-dire forment une boucle) sur plusieurs milliers de paires de bases avant d’atteindre leur site de restriction, déterminé par la “collision” avec une protéine, par exemple une enzyme similaire se déplaçant en sens inverse. L’observation d’un tel processus à l’échelle de la molécule individuelle est la suite logique de nos expériences, et constituerait un premier exemple d’étude de l’interaction concertée de plusieurs protéines avec le même brin d’ADN. Ces expériences pourraient apporter une vérification qualitative des modèles proposés par les biochimistes, ainsi que des éléments quantitatifs, comme la vitesse de progression des enzymes, l’existence de pauses ou les paramètres associés à la collision provoquant la coupure, plus difficiles à obtenir par des mesures d’ensemble. La conduite de ces expériences nécessitera de mettre en place des collaborations avec des biochimistes intéressés par nos méthodes.

Références

- [1] C.B. Murray, D.J. Norris and M.G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 8706 (1993).
- [2] M.A. Hines and P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.* **100**, 468 (1996).
- [3] B.O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. Mikulec, J.R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K.F. Jensen, M.G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B* **101**, 9463 (1997)
- [4] X. Peng, M.C. Schlamp, A. Kadavanich, and A.P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7019 (1997).
- [5] M.A. Reed, J.N. Randall, R.J. Aggarwal, R.J. Matyi, T.M Moore, and A.E. Wetsel. *Phys. Rev. Lett.* **60**, 535 (1988).
- [6] A.P. Alivisatos, *Science* **271**, 933 (1996).
- [7] W. Moerner and M. Orrit, *Science* **283**, 1670 (1999).
- [8] X.S. Xie and J. Trautman, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **49**, 441 (1998).
- [9] S. Weiss, *Science* **283**, 1676 (1999).
- [10] E.J. Peterman, H. Sosa, and W.E. Moerner, *Annu Rev. Phys. Chem.* **79**, 55 (2004).
- [11] S. Empedocles and M. Bawendi, *Acc. Chem. Res.* **32**, 389 (1999).
- [12] M. Nirmal, B.O. Dabbousi, M.G. Bawendi, J.J. Macklin, J.K. Trautman, T.D. Harris and L.E. Brus, *Nature* **383**, 802 (1996).
- [13] S. Empedocles and M. Bawendi, *Science* **278**, 2114(1997).
- [14] S. Coe, W.-K. Woo, M.G. Bawendi and V. Bulovic, *Nature* **420**, 800 (2002).
- [15] M. Achermann, M. A. Petruska, S. Kos, D. L. Smith, D. D. Koleske and V.I. Klimov, *Nature* **429**, 642 (2004).
- [16] W.U. Huynh, J.J. Dittmer, and A.P. Alivisatos, *Science* **295**, 2425 (2002).
- [17] V. Klimov, A. Mikhailovsky, S. Xu, A. Malko, J. Hollingsworth, C. Leatherdale, H. Eisler, and M. Bawendi, *Science* **290**, 314 (2000).
- [18] A. Malko, A. Mikhailovsky, M. Petruska, J. Hollingsworth, H. Htoon, M. Bawendi and V. Klimov, *Appl. Phys. Lett.* **81**, 1303 (2002).
- [19] P. Lodahl, A. Van Driel, I. Nikolaev, A. Irman, K. Overgaag, D. Vanmaekelbergh, and W.L. Vos, *Nature* **430**, 654 (2004).
- [20] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A.P. Alivisatos, *Science* **281**, 2013 (1998).
- [21] W. Chan and S. Nie, *Science* **281**, 2016 (1998).
- [22] A.P. Alivisatos, *Nat. Biotech.* **22**, 47 (2004).
- [23] J.K. Jaiswal and S.M. Simon, *Trends in Cell Biology* **14**, 497 (2004).
- [24] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss, *Science* **307**, 538 (2005).
- [25] X. Peng *et al.*, *Nature* **404**, 59 (2000).
- [26] D. Milliron, S.M. Hughes, Y. Cui, L. Manna, L.W. Wang, and A.P. Alivisatos, *Nature* **430**, 190 (2004).
- [27] F. Patolsky, G. Zheng, O. Hayden, M. Lakadamyali, X. Zhuang, and C.M. Lieber, *Proc. Natl. Acac. Sci.* **101**, 14017 (2004).

- [28] Y. Yin, R.M. Rioux, C.K. Erdonnez, S. Hughes, G.A. Somorjai, and A.P. Alivisatos, *Science* **304**, 711 (2004).
- [29] T. Mokari, E. Rothenberg, I. Popov, R. Costi, and U. Banin, *Science* **304**, 1787 (2004).
- [30] J. Hu, L. Li, W. Yang, L. Manna, L. Wang, and A.P. Alivisatos, *Science* **292**, 2060 (2001).
- [31] X. Brokmann, "*Propriétés de fluorescence de nanocristaux de CdSe individuels*", Thèse de doctorat de l'Université Paris 6 (2004).
- [32] R. Dickson, A. Cubitt, R. Tsien and W.E. Moerner, *Nature* **388**, 355 (1997).
- [33] F. Kulzer, S. Kummer, R. Matzke, C. Brauchle, T. Basche, *Nature* **387**, 688 (1997).
- [34] L.A. Peyser, A.E. Vinson, A.P. Bartko, and R. M. Dickson, *Science* **291**, 103 (2001).
- [35] D. VanDenBout *et al.*, *Science* **277**, 1074 (1997).
- [36] H. Htoon, M.J. O'Connell, P. Cox, S. Doorn and V.I. Klimov, *Phys. Rev. Lett.* **93**, 27401 (2004).
- [37] K. T. Shimizu *et al*, *Phys. Rev. B* **63**, 205316 (2001).
- [38] M.-E. Pisol *et al.*, *Phys. Rev. B* **59**, 10725 (1999).
- [39] M.D. Mason, G.M. Credo, K.D. Weston and S.K. Buratto, *Phys. Rev. Lett.* **80**, 5404 (1998).
- [40] M. Kuno *et al*, *J. Chem. Phys.* **112**, 3117 (2000).
- [41] M. Kuno *et al*, *J. Chem. Phys.* **115**, 1028 (2001).
- [42] F. Bardou, J.P. Bouchaud, A. Aspect, C. Cohen-Tannoudji, *Lévy Statistics and Laser Cooling*, Cambridge University Press (2001).
- [43] J. Reichel, F. Bardou, M. Dahan, E. Peik, S. Rand, C. Salomon and C. Cohen-Tannoudji, *Phys. Rev. Lett.* **75**, 4575 (1995).
- [44] W. Feller, *An Introduction to Probability and its Applications*, Wiley, New York (1968).
- [45] C. Godrèche, J.M. Luck, *J. Stat. Phys.* **104**, 489 (2001).
- [46] X. Brokmann, J.-P. Hermier, G. Messin, P. Desbiolles, J.P. Bouchaud, et M. Dahan, *Phys. Rev. Lett.* **90**, 120601-1 (2003).
- [47] R. Zindervan, F. Kulzer, S.B. Orlinskii, and M. Orrit, *J. Phys. Chem. A* **107**, 6770 (2003).
- [48] P. Didier, *Propriétés optiques de marqueurs fluorescents d'intérêt biologique en interaction avec leur environnement : étude par spectroscopie femtoseconde*, Thèse de doctorat de l'Université de Strasbourg (2004).
- [49] F. Amblard, communication privée.
- [50] T.D. Krauss and L.E. Brus, *Phys. Rev. Lett.* **83**, 4840 (1999).
- [51] K.T. Shimizu, W.K. Woo, B.R. Fisher, H.J. Eisler and M.G. Bawendi, *Phys. Rev. Lett.* **89**, 117401 (2002).
- [52] S. Hohng and T. Ha, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 1324 (2004).
- [53] B. Lounis, H.A. Bechtel, D. Gerion, A.P. Alivisatos, W.E. Moerner, *Chem. Phys. Lett.* **329**, 399 (2000).
- [54] P. Michler, A. Imamoglu, M.D. Mason, P.J. Carson, G.F. Strouse, and S. K. Buratto, *Nature* **406**, 968 (2000).
- [55] G. Messin, J.-P. Hermier, E. Giacobino, P. Desbiolles et M. Dahan, *Opt. Lett.* **26**, 1891 (2001).

- [56] B. Fisher, J.M. Caruge, M. Bawendi, Phys. Rev. Lett. **94**, 087403 (2005).
- [57] V. Klimov, A. Mikhailovsky, D.W. McBranch, C.A Leatherdale and M. Bawendi, Science **287**, 1011 (2000).
- [58] G. Margolin, E. Barkai, J. Chem. Phys. **121**, 1566 (2004). G. Markolin and E. Barkai, cond-mat/0406381.
- [59] X. Brokmann, E. Giacobino, M. Dahan et J.-P. Hermier, Appl. Phys. Lett. **85**, 712 (2004).
- [60] X. Brokmann, G. Messin, P. Desbiolles, E. Giacobino, M. Dahan and J.-P. Hermier, New Journal of Physics **6**, 99 (2004).
- [61] M.D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S.M. Block, Biophys. J. **72**, 1335 (1997).
- [62] C. Bouchiat, M.D. Wang, J.-F. Allemand, T. Strick, S.M. Block and V. Croquette, Biophys. J. **76**, 409 (1999).
- [63] T.R. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette, Science **271**, 1835 (1996).
- [64] T.R. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, and V. Croquette, Biophys. J. **74**, 2016 (1998).
- [65] Z. Bryant, M.D. Stone, J. Gore, S.B. Smith, N.R. Cozzarelli, and C. Bustamante, Nature **424**, 338 (2003).
- [66] M.D. Wang, M.J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, Science **282**, 902 (1998).
- [67] G.J. Wuite, S.B. Smith, M. Young, D. Keller, and C. Bustamante, Nature **404**, 103 (2000).
- [68] G. Charvin, D. Bensimon and V. Croquette, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 9820 (2003).
- [69] D.A. Koster, V. Croquette, C. Dekker, S. Shuman, and N. H. Dekker, Nature **434**, 671 (2005).
- [70] D. Axelrod, T. Burghardt, and N. Thompson, Annual Review of Biophysics and Bioengineering **13**, 247 (1984).
- [71] B. van den Broek, F. Vanzi, D. Normanno, F.S. Pavone, and G.J. Wuite, Nucleic Acids Res. **34** 167 (2006).
- [72] F. Vanzi, C. Broggio, L. Sacconi, F.S. Pavone, Nucleic Acids Res. **34** 3409 (2006).
- [73] S.F. Tolic-Norrelykke, M.B. Rasmussen, F.S. Pavone, K. Berg-Sorensen, L.B. Oddershede, Biophys. J. **90**, 3694 (2006).
- [74] S.B. Smith, L. Finzi and C. Bustamante, Science **258**, 1122 (1992).
- [75] P. Thomen, P.J. Lopez, and F. Heslot, Phys. Rev. Lett. **94** 128102 (2005).
- [76] Y. Harada, T. Funatsu, K. Murakami, Y. Nonoyama, A. Ishihama and T. Yanagida, Biophys. J, **76**, 709 (1999).
- [77] B. Van der Broek, M.C. Noom, and G.J. Wuite, Nucleic Acids Res. **33**, 2676 (2005)
- [78] B. Ladoux, J.P. Quivy, P. Doyle, O. du Roure, G. Almouzni, and J.L. Viovy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 14251 (1997).
- [79] S. Matsuura, J. Komatsu, K. Hirano, H. Yasuda, K. Takashima, S. Katsura, and A. Mizuno, Nucleic Acids Res. **29**, E79 (2001).
- [80] B. Schäfer, H. Gemeinhardt, V. Uhl, and K.O. Greulich, Single Mol. **1**, 33 (2000).
- [81] M. Spies, P.R. Bianco, M.S. Dillingham, N. Handa, R.J. Baskin, and S.C. Kowalczykowski, Cell **114** 647 (2003).

- [82] M. Washizu, O. Kurosawa, I. Arai, S. Suzuki, and N. Shimamoto, *IEEE Trans. Ind. Appl.*, **31**, 447 (1995).
- [83] F. Dewarrat, M. Calame, and C. Schönenberger, *Single Mol.*, **3**, 189 (2002).
- [84] T.T. Perkins, S.R. Quake, D.E. Smith, and S. Chu, *Science* **264**, 822 (1994).
- [85] P.S. Doyle, B. Ladoux and J.-L. Viovy, *Phys. Rev. Lett.* **84**, 4769 (2000).
- [86] B. Ladoux and P.S. Doyle, *Europhys. Lett.* **52**, 511 (2000).
- [87] P.C. Blainey, A.M. van Oijen, A. Banerjee, G.L. Verdine, and X.S. Xie, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 5752 (2006).
- [88] A. Bensimon, A. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, and D. Bensimon, *Science* **265**, 2096 (1994).
- [89] D. Bensimon, A. Simon, V. Croquette, and A. Bensimon, *Phys. Rev. Lett.* **74**, 4754 (1995).
- [90] X. Hu, C. Aston, and D.C. Schwartz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 466 (1999).
- [91] Z. Guéroui, C. Place, E. Freyssingéas, and B. Berge, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6005 (2002).
- [92] C. Bustamante, S.B. Smith, and Y. Cui, *Science* **271**, 795 (1996).
- [93] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.-L. Viovy, D. Chatenay and F. Caron, *Science* **271**, 792 (1996).
- [94] C. Bustamante, J.F. Marko, E.D. Siggia, and S. Smith, *Science* **265**, 1599 (1994).
- [95] B.H. Zimm, *J. Chem. Phys.* **24**, 269 (1956).
- [96] M. Doi and S.F. Edwards, Oxford Science, Oxford (1986).
- [97] R.G. Larson, T.T. Perkins, D.E. Smith, and S. Chu, *Phys. Rev. E* **55**, 1794 (1997).
- [98] S.R. Quake, H.P. Babcock, and S. Chu, *Nature* **264**, 151 (1997).
- [99] X. Meng, W. Cai, and D. C. Schwartz, *J Biomol Struct Dyn.* **13**, 945 (1996).
- [100] S. Matsuura, J. Komatsu, K. Hirano, H. Yasuda, K. Takashima, S. Katsura, and A. Mizuno, *Nucl. Acids Res.* **29**, e79 (2001).
- [101] B. Géron-Landre, T. Roulon, P. Desbiolles, and C. Escudé, *Nucl. Acids Res.* **31**, e125 (2003).
- [102] H. Oana, M. Ueda, and M. Washizu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 140 (1999).
- [103] J.R. Taylor, M. M Fang, and S. Nie, *Anal. Chem.* **72**, 1979 (2000).
- [104] J.M. Zijlmans, U.M. Martens, S.S. Poon, A.K. Raap, H.J. Tanke, R.K. Ward, P.M. and Lansdorp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7423 (1997).
- [105] M.D. 3rd Johnson and J.R. , *Chromosoma* **108**, 181 (1999).
- [106] K. Maeshima, S. Janssen, and U.K. Laemmli, *Embo J.* **20** 3218 (2001).
- [107] A.D. Riggs, S. Bourgeois, and M. Cohn, *Biophys. Chem.* **9**, 413 (1979).
- [108] M.V. Smoluchowski, *Z. Phys. Chem.* **92**, 129 (1917).
- [109] R.B. Winter, O.G. Berg, and P. H. Von Hippel, *Biochemistry* **20**, 6961 (1981).
- [110] B.J. Terry, W.E. Jack, and P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **260**, 13130 (1985).
- [111] W.E. Jack, B.J. Terry, and P. Modrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4010 (1982).
- [112] H.J. Ehbrecht, A. Pingoud, C. Urbanke, G. Maas and C. Gualerzi, *J. Biol. Chem.* **260**, 6160 (1984).

- [113] S.E. Halford and J.F. Marko, *Nucleic Acids Res.* **32**, 3040 (2004).
- [114] N.P. Stanford, M.D. Szczelkun, J.F. Marko, and S. E. Halford, *EMBO J.* **19**, 6546 (2000).
- [115] A. Jeltsch and C. Urbanke, *Restriction endonucleases* (A. Pingoud editor), 95 (2004).
- [116] M. Kampmann, *J. Biol. Chem.* **279**, 38715 (2004).
- [117] H.X. Zhou, *Biophys. J.* **88**, 1608 (2005).
- [118] M. Slutsky and L. Mirny, *Biophys J.* **87**, 4021 (2004).
- [119] A. Crut, “Diffusion de l’enzyme de restriction EcoRV sur de l’ADN étiré”, Thèse de l’Université Pierre et Marie Curie (2004).
- [120] J.M. Schurr, *J. Mol. Biol.* **53**, 401 (1970).
- [121] A. Jeltsch and A. Pingoud, *Biochemistry* **37**, 2160-2169 (1998).
- [122] D.M. Gowers and S.E. Halford, *EMBO J.* **22**, 1410 (2003).
- [123] F.K. Winkler, D.W. Banner, C. Oefner, D. Tsernoglou, R.S. Brown, S.P. Heathman, R.K. Bryan, P.D. Martin, K. Petratos, and K.S. Wilson, *EMBO J.* **12**, 1781 (1993).
- [124] J.D. Taylor, I.G. Badcoe, A.R. Clarke, and S.E. Halford, *Biochemistry* **30** 8743 (1991).
- [125] I. Barry Vipond, G.S. Baldwin, and S.E. Halford, *Biochemistry* **34**, 697 (1995).
- [126] G.S. Baldwin, R.B. Sessions, S.G. Erskine, and S.E. Halford, *J. Mol. Biol.* **288**, 87 (1999).
- [127] S. Husale, W. Grange and M. Hegner, *Single Mol.* **3**, 91 (2002).
- [128] L.E. Engler, K.K. Welch, and L. Jen-Jacobson, *J. Mol. Biol.* **269**, 82 (1997).
- [129] S.G. Erskine, G.S. Baldwin, and S.E. Halford, *Biochemistry* **36**, 7567 (1997).
- [130] M. Arrio-Dupont, S. Cribier, G. Foucault, P.F. Devaux, and A. d’Albis, *Biophys. J.* **70**, 2327 (1996).
- [131] X. Gao, Y. Cui, R.M. Levenson, L.W.K. Chung, and S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **22**, 969 (2004).
- [132] C. Luccardini, C. Tribet, F. Vial, V. Marchi-Artzner, and M. Dahan, *Langmuir* **22**, 2304 (2006).
- [133] M. Barbi, C. Place, V. Popkov, and M. Salerno, *Phys. Rev. E* **70**, 041901 (2004).
- [134] A. Granéli, C.C. Yeykal, R.B. Robertson, and E.C. Greene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 1221 (2006).
- [135] H. Kabata, W. Okada, and M. Washizu, *Jpn. J. Appl. Phys.* **39**, 7164 (2000).
- [136] G. Pljevaljcic, F. Schmidt, and E. Weinhold, *ChemBioChem* **5**, 265 (2004).
- [137] B. van den Broek, M.C. Noom, and G.J. Wuite, *Nucleic Acids Res.* **33**, 2676 (2005).
- [138] T. Roulon, C. Hélène, and C. Escudé, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**, 1523 (2001).
- [139] M. Bello-Roufai, T. Roulon, and C. Escudé, *Chem. Biol.* **11**, 509 (2004).