

# Mesure, sans contact, des forces agissant sur les protéines dans les microdomaines membranaires

J.-B. Masson<sup>1</sup>, D. Casanova<sup>2</sup>, S. Turkcan<sup>2</sup>, G. Voisinne<sup>1</sup>, M.R. Popoff<sup>1</sup>, M. Vergassola<sup>1</sup>, & A. Alexandrou<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut Pasteur, 25/28 rue du Docteur Roux, 75116, Paris France

<sup>2</sup> Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau, France

[jbmasson@pasteur.fr](mailto:jbmasson@pasteur.fr)

**Résumé.** Le développement de marqueurs efficaces tel les fluorophores organiques et les nanoparticules, afin de pouvoir suivre leurs trajectoires, a été motivé, entre autres, par la volonté de dresser des cartes de forces agissant sur les biomolécules. Les méthodes usuelles utilisent des observables statistiques, principalement l'écart quadratique moyen, afin d'accéder à certains éléments de la dynamique de ces marqueurs. Dans ce papier, nous introduisons une méthode générale d'inférence [1] pour exploiter complètement toute l'information stockée dans les trajectoires expérimentales. Cette méthode donne accès à des estimations précises des forces ainsi qu'à la diffusivité dans ces microdomaines. Nous avons démontré l'efficacité de ces inférences, à savoir des convergences rapides et très reproductibles, par des simulations reproduisant les conditions expérimentales. La méthode fut ensuite appliquée afin d'extraire les forces et les potentiels agissant sur le récepteur de la toxine  $\epsilon$ , qui fut préalablement marquée par des nanoparticules basées sur des ions lanthanides. La méthode que nous présentons est applicable à n'importe quel biomolécule marquée, de même qu'à n'importe quel système dont on peut suivre la trajectoire confinée, et montre tout son intérêt dans l'analyse des dynamiques prenant place dans les microdomaines membranaires.

**Abstract.** Mapping of the forces acting on biomolecules in cell membranes has spurred the development of effective labels, e.g. organic fluorophores and nanoparticles, to track trajectories of single biomolecules. Standard methods use particular statistical observables, namely the mean square displacement, to extract cues on the underlying dynamics. Here, we introduce general inference methods to fully exploit information hidden in the experimental trajectories, providing sharp estimates of the forces and the diffusion coefficients within membrane microdomains. Rapid and reliable convergence of the inference scheme is demonstrated on trajectories generated numerically with realistic parameters. The inference method is then applied to infer forces and potentials acting on the receptor of the  $\epsilon$ -toxin labeled by lanthanide-ion nanoparticles. Our scheme is applicable to any labeled biomolecule and results presented here show its general relevance to the issue of membrane compartmentation.

## 1 Introduction

L'intérêt pour les relations entre mouvements des protéines et des lipides et les différentes fonctions biologiques associées n'a cessé de grandir ces dernières années [2]. Les différents mouvements sont généralement enregistrés en suivant des biomolécules uniques marquées par des fluorophores organiques ou des nanoparticules qui permettent la détection par fluorescence, diffusion de la lumière etc. [3]. L'analyse des trajectoires est généralement faite en traçant l'écart quadratique moyen (MSD) en fonction du temps. Des paramètres tels les coefficients de diffusion et les tailles de domaines sont mesurés par les modélisations des courbes de MSD suivant différents groupes de modèles, tel la diffusion Brownienne libre, la diffusion dirigée, confinée anormale etc. [3].

Le débat sur la nature du confinement membranaire nourrit l'intérêt pour le suivi des biomolécules. La diffusion libre des protéines dans une mer de lipide fut postulée en premier dans un modèle nommé "fluid mosaic model" [4]. Cependant, suite à diverses observations expérimentales deux nouveaux modèles sont apparus, le modèle "picket and fence" [6] et le modèle "lipid raft" [5]. Ce dernier modèle voit les protéines se placer préférentiellement dans des domaines de composition lipidiques différentes de la plupart des lipides de la membrane. Le premier (nouveau) modèle voit plutôt la compartementalisation naître de l'action combinée du cytosquelette et de protéines transmembranaires figées dans la membrane. D'autres

modèles sont basés sur des interactions plus spécifiques entre protéines [7,8]. La complexité vient aussi du fait que ces modèles ne sont pas mutuellement exclusifs [9].

Les différentes approches basées sur l'analyse du MSD ont été abondamment utilisées. Des approches alternatives telles celles liées au temps de premier passage [10], qui ne sont pas sans rappeler le sempiternel débat de la diffusion des bouées de mer [11,12], et celles basées sur les densités radiales d'occupation [13] se sont avérées donner des résultats intéressants. Cependant, de nombreuses informations supplémentaires sont cachées dans la trajectoire complète. Réduire l'analyse à un moment unique d'une distribution a pour avantage de simplifier l'analyse, mais a pour prix à payer une perte d'information conséquente sur la dynamique de la trajectoire. Tout particulièrement, cela rend la possible analyse de la validité des modèles extrêmement difficile, et la différenciation parmi ceux-ci assez compliquée. Nous avons choisi une approche générale basée sur les inférences bayésiennes [14] dans lequel l'analyse se fera sur les probabilités propres (likelihoods) de ces modèles. Un sens quantitatif de la validité de ces modèles est ainsi obtenu, avec une estimation systématique des paramètres ainsi que de leurs incertitudes.

Notre but est de présenter une approche générale basée sur des inférences bayésiennes donnant accès à des cartes de forces ainsi qu'à des cartes de potentiel impliquées dans le confinement des biomolécules dans la membrane cellulaire. Nous montrerons que ces inférences donnent accès à des estimations très précises des forces agissant dans ces domaines. Nous appliquerons principalement cette méthode aux mouvements de la toxine  $\epsilon$  dans la membrane des cellules "Madin-Darby canine kidney (MDCK)".

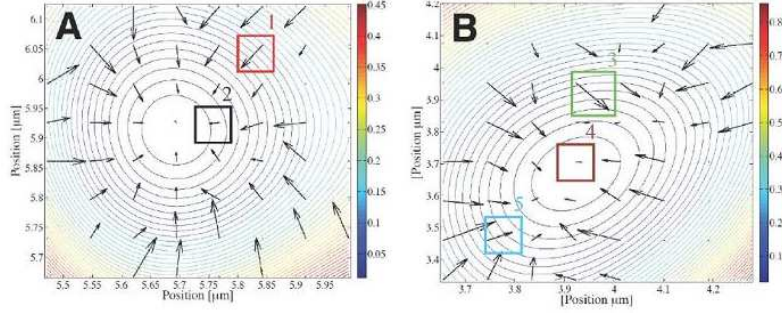
## 2 Expériences

La toxine  $\epsilon$ , sécrétée par *Clostridium perfringens* (type B et D) une bactérie Gram-positive, est responsable de l'enterotoxémie létale. Une prototoxine relativement inactive est synthétisée dans un premier temps, et est convertie ensuite en une protéine dangereuse par clivage et retrait de l'acide aminé terminal. La protéine mature prend pour cible un récepteur spécifique localisé dans des domaines, résistants aux détergents, des cellules MDCK [15]. Cette protéine agit par heptamérisation ; elle forme ainsi des pores dans la membrane provoquant une modification rapide de la perméabilité aux ions, et tue la cellule sans que la protéine ne soit jamais entrée dans le cytosol [16,17].

Des nanoparticules d'oxydes de lanthanides recouvertes de fonctions amines (NPs)  $Y_{0.6}Eu_{0.4}VO_4$  de tailles comprises entre 30 et 50 nm furent utilisées pour marquer la toxine  $\epsilon$ . Une description de la méthode aboutissant à un ratio moyen de 1 :1 de toxine/nanoparticule est exposé dans la référence [18]. Ces nanoparticules ont de nombreux avantages : elles sont très grandement photostables, ne présentent pas d'intermittences d'émissions de lumière, sont synthétisées directement dans l'eau et ont une émission fréquentielle très étroite. Ceci permet un rejet simple de la fluorescence venant de la cellule [20]. Une relation directe permet de lier leurs tailles à la luminosité mesurée [21]. Enfin, différentes couleurs d'émissions sont obtenues en utilisant différents ions lanthanides [19].

Nous utilisâmes un microscope grand champ inversé (Zeiss Axiovert 100) équipé d'un objectif 63x, NA=1.4 "oil-immersion" et l'acquisition des images fut fait par une camera EM-CCD (Roper Scientific QuantEM :512SC). Les ions  $Eu^{3+}$  des nanoparticules furent excités avec la ligne 465.8-nm d'un laser  $Ar^+$ -ion et leurs émissions furent détectées en utilisant un filtre 617/8M (Chroma). Les cellules MDCK furent cultivées jusqu'à confluence sur des lamelles en verre. Elles furent rincées, incubées avec 0.04 nM de toxines  $\epsilon$  marquées (ou prototoxins) pendant 20 minutes, rincées trois fois et observées dans un tampon de Hank contenant 1% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicillin-streptomycin soit à 20°C soit à 30°C.

Durant toutes les expériences ( $\sim 400$  cellules), nous observâmes les liens entre de nombreuses nanoparticules et un récepteur spécifique sur la surface cellulaire. Nous vérifiâmes la spécificité de ces liens en préincubant la toxine pendant une heure avec un anticorps de la toxine  $\epsilon$  qui empêche la fixation à la membrane (en suivant la même procédure que celle décrite dans la référence [16]) et en constatant l'absence de fixation des nanoparticules à la membrane cellulaire. Les toxines furent gardées à des concentrations suffisamment basses pour être sûre que seule la trajectoire d'une toxine (et pas des oligomères) était suivie. Le ratio moyen de toxine nanoparticule de 1 :1 implique, si l'on suppose une statistique de Poisson, que la fraction de nanoparticules fixée à 0, 1 et 2 ou plus de toxines est respectivement de 37%, 37% et 26%. Les nanoparticules non liées à une toxine ne se fixent pas aux cellules, et sont évacuées par



**Fig. 1.** Champ de forces et potentiels inférés dans deux domaines membranaires. La longueur des flèches est proportionnel à l'amplitude de la force. Le potentiel est tracé par des courbes de niveaux dont la barre d'amplitude est placée à côté. Le schéma d'interpolation décrit dans le texte fut utilisé, aboutissant à un temps effectif entre 2 images de 5 ms. Le coefficient de diffusion pour **A** est  $4.75 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  et pour **B** est  $8.15 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ . Les distributions *a posteriori* des 5 zones encadrées sont données dans la figure 4.

un simple rinçage. Etant donné la taille des nanoparticules, il est peu probable que plus d'une toxine soit présente dans la même zone de la surface de la nanoparticule permettant une liaison simultanée à plus d'un récepteur. De plus, la possibilité de lien d'une fraction des toxines peut être réduite par le couplage aux nanoparticules. Nous estimons que la fraction des nanoparticules liées à plus d'un récepteur est moins de 10%. De plus, nous marquâmes des toxines  $\epsilon$  avec un fluorophore organique, le Cy3, et observâmes le même type de trajectoires. Ceci a pour conséquence que le marquage par nanoparticule ne modifie pas le mouvement du récepteur, qui est ainsi déterminé par la masse du récepteur, et par les caractéristiques de la membrane. Le mouvement des récepteurs fut étudié pendant des périodes allant de 150 à 300 secondes. Nous vérifiâmes qu'étant donné le coefficient de diffusion et la taille des domaines, nous ne fûmes pas limités par le temps d'acquisition des images (21.4 à 51.4 ms) [22,23]. Des portions relativement courtes des trajectoires furent utilisées afin d'exclure tout déplacement des domaines membranaires, de la cellule ou du microscope.

### 3 Inférences des forces et du potentiel

L'équation de Langevin pour la position  $\mathbf{r}(t)$  et pour la vitesse  $\mathbf{v}(t)$  d'une biomolécule sujette à la diffusion moléculaire et aux forces engendrées par un potentiel  $V$  sont :

$$\frac{d\mathbf{r}}{dt} = \mathbf{v}; \quad m \frac{d\mathbf{v}}{dt} = -\gamma \mathbf{v} - \nabla V(\mathbf{r}) + \sqrt{2D\gamma^2} \xi. \quad (1)$$

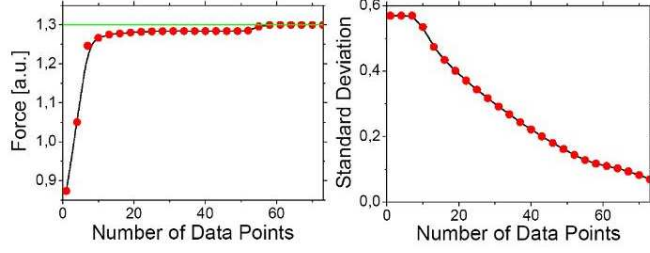
Ici,  $m$  est la masse de la biomolécule,  $\gamma$  et  $D = kT/\gamma$  sont la friction et le coefficient de diffusion dans le microdomaine membranaire. Le bruit gaussien de moyenne nulle  $\xi(t)$  fluctue rapidement avec le temps, à cause du bruit thermique. Le mouvement de la biomolécule permet d'appliquer l'approximation de Smoluchowski [24] à l'équation (1). En effet le temps caractéristique de relaxation de la vitesse vers un équilibre local est  $\tau = \frac{m}{\gamma} \simeq 10^{-16} \text{s}$  (puisque  $m \simeq 10^{-22} \text{kg}$  et  $\gamma \simeq 10^{-6} \text{kg/s}$  [25]). Ainsi la vitesse est mue par le forçage local et l'équation (1) se réduit à :

$$\frac{d\mathbf{r}}{dt} = -\frac{\nabla V(\mathbf{r})}{\gamma} + \sqrt{2D} \xi. \quad (2)$$

L'équation de Fokker-Planck [26] associée à l'équation (2) est :

$$\partial_t P = -\frac{1}{\gamma} \nabla \cdot (\mathbf{F} P) + D \Delta P, \quad (3)$$

ou la force satisfait  $\mathbf{F} \equiv -\nabla V$ . L'équation de Kolmogorov (3) décrit la dynamique de la transition de probabilité  $P(\mathbf{r}, t | \mathbf{r}_0, t_0)$  d'aller au point  $(\mathbf{r}, t)$  sachant que la biomolécule était originellement  $(\mathbf{r}_0, t_0)$ . La



**Fig. 2.** Evolution typique de la valeur d'une force locale inférée (à gauche) et de sa déviation standard (à droite) avec le nombre de points utilisé pour les inférer. Il faut remarquer la convergence rapide vers la vraie valeur de la force (indiquée par la ligne horizontale).

solution de l'équation (3) peut être écrite sous forme d'une intégrale de chemin [27] :

$$P(\mathbf{r}, t | \mathbf{r}_0, t_0) \propto \int \mathcal{D}\mathbf{r}(s) e^{-\int ds Q(\mathbf{r}(s))}. \quad (4)$$

le terme  $Q(\mathbf{r}(s)) \equiv (d\mathbf{r}(s)/ds - \mathbf{F}(\mathbf{r}(s))/\gamma)^2 / 4D$  est le poids quadratique gaussien gouvernant la probabilité des déplacements pour un interval infinitésimal de temps.

En pratique, l'espace est discrétisé en une fine grille régulière de  $n^2$  carrés. La taille caractéristique du grillage est choisie de sorte à ce qu'elle soit suffisamment fine pour que le champ de force soit lisse à cette échelle. À l'ordre le plus bas, les forces sont approximées par des valeurs constantes dans chaque zone carrée, nous montrerons par la suite que les variations d'ordre élevées sont en effet négligeables. L'intégrale apparaissant dans l'exponentielle de l'équation (4) est approximée par la somme discrète de Riemann. Les carrés du grillage  $\mathcal{S}_{i,j}$  sont indexés par la paire  $(i, j)$  (avec  $i, j = 1, \dots, n$ ) et la force agissant dans  $\mathcal{S}_{i,j}$  est notée  $\mathbf{F}_{i,j}$ . Le but est de trouver les  $2n^2 + 1$  inconnues  $U = \{D, \{\mathbf{F}_{i,j}\}\}$ , c'est à dire la diffusivité et les forces agissant dans le domaine membranaire. Les variations de  $D$  peuvent être traitées de la même manière (voir plus bas).

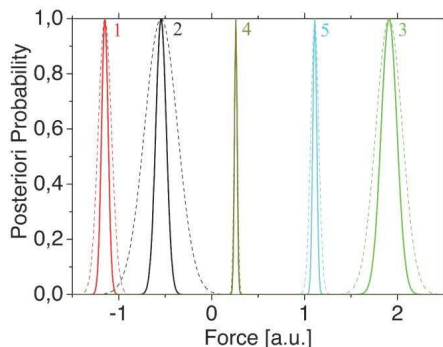
Les méthodes d'inférences [14] font en général appel à deux étapes : a) la dérivation de la probabilité à *posteriori* des paramètres recherchés étant donné une observation expérimentale ; b) l'analyse de la distribution à *posteriori* afin de d'estimer les paramètres. De manière plus spécifique, la formule de Bayes montre que la distribution à *posteriori*  $P(U|T)$  d'un ensemble de paramètres  $U$  suite à une trajectoire  $T$  est  $P(U|T) = P(T|U) \times P_0(U) / P(T)$  ou  $P(T|U)$  est la probabilité (likelihood) d'une trajectoire sachant que les paramètres  $U$  sont connus et  $P(T)$  est une constante de normalisation.  $P_0(U)$  est la probabilité à *priori*, que nous prenons constant. La partie b) fut traitée par la méthode de Monte Carlo afin d'extraire les valeurs moyennes des distributions à *posteriori*. Ces distributions sont généralement bien "piquées" et les valeurs maximales donnent de bonnes estimations des valeurs moyennes.

Un des atouts majeurs de ce problème est que seul la diffusivité  $D$  est un paramètre global alors que les  $n^2$  forces  $\mathbf{F}_{i,j}$  apparaissent sous forme additive dans les exponentielles des probabilités à *posteriori*. Ceci a pour effet que les contributions des différents carrés de la grille se factorisent en  $P(U|T) = \prod_{i,j=1}^n P(\mathbf{F}_{i,j}, D|T)$ . La contribution dans chaque carré de la grille :

$$P(\mathbf{F}_{i,j}, D|T) \propto \prod_{\mu: \mathbf{r}_\mu \in \mathcal{S}_{i,j}} \frac{\exp\left[-\frac{(\mathbf{r}_{\mu+1} - \mathbf{r}_\mu - \mathbf{F}_{i,j} \Delta t / \gamma)^2}{4D \Delta t}\right]}{4\pi D \Delta t}. \quad (5)$$

Ici  $\mu$  indexe les différentes étapes de temps (discrétisé par  $\Delta t$ ), et le produit se réduit aux temps où la biomolécule est présente dans le carré de la grille  $\mathcal{S}_{i,j}$ . Il faut remarquer que la discrétisation introduit une ambiguïté lorsque la biomolécule traverse un carré pour passer dans un autre. Le choix fait dans l'équation (5) est d'utiliser les indices du carré de départ. Les corrections s'avéreront négligeables.

L'élément crucial qui permet ces distributions bien piquées est le confinement des trajectoires. Ainsi chaque carré de la grille est visité de nombreuses fois, ce qui permet une acquisition conséquente d'information. Même les carrés où les forces sont importantes, et donc le temps de résidences court, la quantité



**Fig. 3.** Distribution à *posteriori* des forces aux localisations données par les carrés sur la figure 1. Les courbes pour les composantes horizontales (verticales) des forces sont 2,4,5 (1,3). Les courbes pleines sont obtenues par le schéma d'interpolation décrit dans le texte. Il est bon de noter que les valeurs moyennes sont extrêmement proches de celles obtenues sans cette interpolation (courbes en pointillées) mais la variance est grandement réduite.

d'information acquise est suffisante, pour permettre de bonnes inférences. Il est bon de noter que les distributions à *posteriori* sont gaussiennes, ce qui apparaît directement dans la formule 5.

Afin d'accéder de manière quantitative à la qualité de l'inférence, nous générâmes de manière numérique des ensembles de trajectoires avec les mêmes champs de forces et diffusivités que ceux qui sont rencontrés expérimentalement. Les distributions à *posteriori* furent bien piquées sur les valeurs utilisées pour les générer. Les évolutions typiques des valeurs inférées avec le nombre de points utilisés pour l'inférence sont montrées sur la figure 2. La convergence est rapide et la déviation standard entoure la vraie valeur même pour des nombres réduits de points. Les prédictions issues de la méthode exposée sont plus précises et nécessitent moins de points que celles basées sur des statistiques uniques comme celles issues du MSD ou de la densité radiale d'occupation. Afin de résumer, les simulations confirment la validité de la méthode d'inférence.

Afin de visualiser les résultats il est utile de tracer le potentiel  $V$  comme sur la figure 1. Le potentiel fut interpolé par un polynôme d'ordre  $C$  ( $C = 4$  dans la Figure 1) :  $V(\mathbf{r}) = \sum_{j=0}^C \sum_{i=0}^j \alpha_{ij} x^i y^{j-i}$ . Les constantes  $\alpha_{ij}$  sont déterminées par les champs de forces expérimentaux, en minimisant l'erreur au carré par la méthode des simplex. Les potentiels trouvés sont compatibles avec un modèle de type "fence", mais ce modèle doit être complété afin de comporter des parties non locales. De même un modèle de changement de nature de lipides ne comporterait que des forces extrêmement localisées. Les potentiels trouvés indiquent clairement la présence de forces non locales. Les variations dans chaque microdomaine de la diffusivité furent faibles, de l'ordre de 4% (à comparer au 65% pour les forces), il est donc raisonnable de considérer que les constantes de diffusion sont constantes dans les microdomaines.

Les erreurs de discrétisations furent contrôlées de la manière suivante. étant donné deux acquisitions  $(\mathbf{x}_1, t_1)$  et  $(\mathbf{x}_2, t_2 = t_1 + \Delta t)$ , nous interpolâmes leur probabilité de transition en sommant sur toutes les positions possibles  $\mathbf{x}'$  aux temps intermédiaires  $t' = t_1 + \Delta t/2$ , c'est à dire  $P(x_2, t_2 | x_1, t_1) = \int dx' P(x_2, t_2 | x', t') P(x', t' | x_1, t_1)$ . Ce processus peut raffiner en sommant sur de plus nombreux points intermédiaires. L'effet principal de cette interpolation est de réduire les barres d'erreurs, les valeurs restant quasiment constantes (Figure 3).

## 4 Conclusion

Nous développâmes une méthode d'inférence qui permet d'exploiter les informations stockées dans les trajectoires de biomolécules marquées. Cette méthode est applicable à n'importe quelle trajectoire de biomolécule, même celles présentant des intermittences comme celles issues de quantum dots. Nous démontrâmes les avantages de cette méthode en traçant des cartes de forces et de potentiels impliqués dans le mouvement confiné du récepteur de la toxine  $\epsilon$  dans la membrane des cellules MDCK.

## Références

1. J.-B MASSON *et al*, Inferring maps of forces inside cell membrane microdomains, *Phys. Rev. Lett.*, 2009 In Press .
2. M.J. SAXTON, Single-particle tracking : connecting the dots, *Nature Methods.*, **5** 671, 2008.
3. M. J. SAXTON, K. JACOBSON, Single-particle tracking : applications to membrane dynamics, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **26**, 373, 1997.
4. S. J. SINGER, G. L. NICOLSON, The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science*, **175**, 720, 1972.
5. K. SIMONS, E. IKONEN, Functional rafts in cell membranes, *Nature*, **387**, 569, 1997.
6. A. KUSUMI *et al.*, Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid : High-speed single-molecule tracking of membrane molecules, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **34**, 351, 2005.
7. F. DAUMAS *et al.*, Confined diffusion without fences of a G protein coupled receptor as revealed by single particle tracking *Biophys. J.* **84**, 356, 2003.
8. J. J. SIEBER *et al.*, Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster, *Science*, **317**, 1072, 2007.
9. P.-F. LENNE *et al.*, Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork, *EMBO J*, **25**, 3245, 2006.
10. S. CONDAMIN *et al.*, First passage times in complex scale invariant media, *Proceedings of the National Academy of Science*, **105**, 5675, 2008.
11. J.H. LACASCE, Statistics from Lagrangian observations, *Progress In Oceanography*, **77**, 1, 1-29, 2008.
12. G. LACORATA, Statistics from Lagrangian observations, *Annales Geophysicae*, **19**, 1, 121-129, 2001.
13. S. JIN *et al.*, Single-Particle Tracking of Membrane Protein Diffusion in a Potential : Simulation, Detection, and Application to Confined Diffusion of CFTR Cl Channels, *Biophys. J.*, **93**, 1079, 2007.
14. D.J.C. MACKAY, *Information Theory, Inference, and Learning Algorithms*, Cambridge University Press, 2003.
15. C. CHASSIN *et al.*, Purification and characterization of Clostridium sordellii lethal toxin and cross-reactivity with Clostridium difficile cytotoxin, *Am. J. Pathol. Renal Physiol.*, **293**, F927-F937, 2007.
16. L. PETIT *et al.*, R. Clostridium perfringens epsilon toxin induces a rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers, *J. Biol. Chem.*, **276**, 15736, 2001.
17. S. MIYATA *et al.*, Clostridium perfringens epsilon -Toxin Forms a Heptameric Pore within the Detergent-insoluble Microdomains of Madin-Darby Canine Kidney Cells and Rat Synaptosomes, *J. Biol. Chem.* **277**, 39463, 2002.
18. D. CASANOVA *et al.*, Counting the Number of Proteins Coupled to Single Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* , **129**, 12592, 2007.
19. V. BUISSETTE *et al.*, Aqueous routes to lanthanide- ; doped oxide nanophosphors, *J. Mat. Chem.*, **16**, 529, 2006.
20. E. BEAUREPAIRE *et al.*, Functionalized Fluorescent Oxide Nanoparticles : Artificial Toxins for Sodium Channel Targeting and Imaging at the Single-Molecule Level, *Nano Lett.*, **4**, 2079, 2004.
21. D. CASANOVA *et al.*, Optical in situ size determination of single lanthanide-ion doped oxide nanoparticles, *Appl. Phys. Lett.*, **89**, 253103, 2006.
22. K. RITCHIE *et al.*, Detection of Non-Brownian Diffusion in the Cell Membrane in Single Molecule Tracking, *Biophys. J.* **88**, 2266, 2005.
23. N. DESTAINVILLE & L. SALOMÉ, Detection of confinement and jumps in single protein membrane trajectories, *Biophys. J.* **90**, L17, 2006.
24. M. SMOLUCHOWSKI, Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen, *Ann. der Physik*, **21**, 756-780, 1906.
25. K. SUZUKI *et al.*, Outer Membrane Monolayer Domains from Two-Dimensional Surface Scanning Resistance Measurements, *Biophys. J.* , **79**, 448, 2000.
26. H. RISKEN, *The Fokker-Planck Equation : Methods of Solutions and Applications*, Springer, 1989.
27. H. KLEINERT, *Path integrals in Quantum Mechanics, Statistics, Polymer Physics and Financial Markets*, World Scientific, 2006.