

Modélisation et estimation de la diffusion de protéines à l'exocytose dans des séquences d'images de microscopie TIRF

A. Basset¹ P. Bouthemy¹ J. Boulanger² F. Waharte² J. Salamero² C. Kervrann¹

¹ Inria, Centre Rennes - Bretagne Atlantique

² UMR 144 CNRS, Institut Curie, Paris

Antoine.Basset@cnes.fr, Patrick.Bouthemy@inria.fr

Résumé

Dans le contexte de l'analyse de la dynamique membranaire, nous proposons un nouveau modèle pour représenter le comportement de protéines au cours de la fusion de vésicules dans la membrane plasmique à la fin du processus d'exocytose. Le modèle introduit incorpore la phase de libération continue des protéines de la vésicule, caractérisée par le taux de libération. Les protéines diffusent ensuite dans la membrane, ce qui ajoute un second paramètre biophysique, le coefficient de diffusion. Une méthode originale est élaborée pour estimer ces deux paramètres à partir d'une séquence d'images. Une évaluation quantitative en démontre l'efficacité, et les résultats sur des séquences réelles de microscopie TIRF permettent de mettre en évidence des différences de comportement des protéines Langerin et TfR.

Mots Clef

Séquence d'images, microscopie TIRF, estimation de la diffusion, exocytose.

Abstract

Interested in membrane dynamics, we propose a new model to represent the behavior of cargo transmembrane proteins during the vesicle fusion to the plasma membrane at the end of the exocytosis process. The model introduces the release rate parameter to account for a continuous release of the proteins from the vesicle to the plasma membrane. The proteins then diffuse to the membrane, thus adding a second biophysical parameter, the diffusion coefficient. An automatic method is proposed to estimate both parameters in TIRFM image sequences. Quantitative evaluation demonstrates the efficiency of the method, which is finally employed to exhibit differences in the behaviors of TfR and Langerin proteins.

Keywords

Image sequence, TIRF microscopy, vesicle fusion model, membrane diffusion estimation.

1 Introduction et contexte

Identifier les comportements dynamiques de protéines, à partir de séquences d'images de la cellule par microscopie de fluorescence, est d'une importance primordiale pour comprendre les mécanismes cellulaires. Dans le cas du trafic membranaire, les molécules cargo sont transférées d'un donneur à un compartiment accepteur [21]. Pendant le processus d'exocytose, une vésicule transmet les molécules cargo à la membrane plasmique. La microscopie de fluorescence de type TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) est particulièrement bien adaptée pour visualiser les étapes tardives de l'exocytose, qui se produisent à la membrane plasmique [7]. Cependant, même avec cette modalité, estimer la dynamique de diffusion des protéines concernées reste une tâche difficile.

Dans cet article, nous étudions la dynamique de deux protéines transmembranaires associées à des vésicules pendant le processus d'exocytose : la protéine Transferrin Receptor (TfR) et la protéine Langerin. A la fin de l'exocytose, la vésicule s'ouvre et fusionne avec la membrane plasmique, dans laquelle les protéines transmembranaires diffusent ensuite.

La dynamique des protéines transmembranaires au sein de la membrane plasmique est généralement considérée comme étant une diffusion latérale [11]. Des modèles plus complexes ont été néanmoins proposés pour prendre en compte les interactions entre les protéines et les structures membranaires [22, 26] ou pour appréhender une composante de rotation [9, 28]. Cependant, comme nous nous focalisons sur une petite zone autour de l'emplacement de la fusion des vésicules, nous pouvons admettre que la membrane est localement homogène. En outre, il a été montré que la composante de rotation reste négligeable par rapport à la composante latérale [1].

L'article est organisé de la manière suivante. Un bref état de l'art est fourni à la section 2. Nous présentons notre nouveau modèle, dénommé SE-LDE, à la section 3. La section 4 est consacrée à la détection des événements de fusion de vésicules, et à l'estimation des paramètres du modèle SE-LDE. Les résultats expérimentaux sont regroupés dans la section 5, et la section 6 conclut l'article.

2 Etat de l’art et positionnement

A notre connaissance, la modélisation de la diffusion dans la membrane plasmique après fusion des vésicules n’a été abordée que dans [4, 5, 8]. Le modèle de source ponctuelle y est utilisé, mais ce dernier repose sur des hypothèses restrictives pouvant donner des résultats inadéquats. Nous proposons un modèle de fusion de vésicule original et plus complet, se fondant sur deux hypothèses plus réalistes. Tout d’abord, nous ne supposons plus une source ponctuelle, mais une source ayant une certaine étendue spatiale, avec la contrainte toutefois que la taille de la vésicule reste inférieure au rayon de la réponse impulsionnelle (PSF) du microscope. En second lieu, nous tenons compte que les protéines sont libérées de façon progressive et non instantanée dans la membrane plasmique, après que la fusion de la vésicule a eu lieu. Nous modéliserons cette phase de libération par une décroissance exponentielle, au cours du temps, du nombre de protéines contenues dans la vésicule. Nous dénommerons ce nouveau modèle par le sigle SE-LDE (“source étendue avec libération à décroissance exponentielle”).

En ce qui concerne l’estimation du coefficient de diffusion, de nombreuses méthodes ont été proposées pour l’estimer avec des modèles différents que celui proposé dans cet article. Elles peuvent être regroupées en trois classes : *i*) les méthodes exploitant le calcul de trajectoires ou l’acquisition de type Single Particle Tracking (SPT) [15, 23, 24]; *ii*) les méthodes de type Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) qui reposent sur la corrélation d’intensité spatiale et/ou temporelle de fenêtres de points [12, 13, 14, 19]; *iii*) les méthodes d’ajustement direct dans lequel un modèle d’intensité est formulé et estimé dans un volume spatio-temporel local de la séquence d’images de microscopie [5, 8, 27].

Cependant, dans les images de microscopie TIRF que nous traitons, les protéines ne sont pas individuellement résolues, car elles sont trop près les unes des autres pour la résolution du microscope, ce qui exclut les techniques SPT. Par ailleurs, les méthodes FCS, telles que la méthode STICS [14], exigent que toutes les protéines subissent un mouvement brownien. Or, cette contrainte ne tient pas dans notre modèle SE-LDE, car par construction une partie des protéines est encore statique à tout moment avant leur libération. Enfin, parmi les méthodes d’ajustement direct sur les intensités, notre approche précédente [5] est performante pour le modèle de source ponctuelle, mais ne suffit plus pour une estimation fiable des paramètres du modèle SE-LDE proposé. Nous allons définir une méthode plus élaborée.

3 Définition du modèle SE-LDE

Lorsque la vésicule fusionne avec la membrane au moment t_0 , les protéines sont libérées dans la membrane et commencent à diffuser. Ceci est illustré à la figure 1 où nous affichons une imagerie, extraite d’une image TIRF autour d’un spot correspondant à une vésicule, et son évolution au

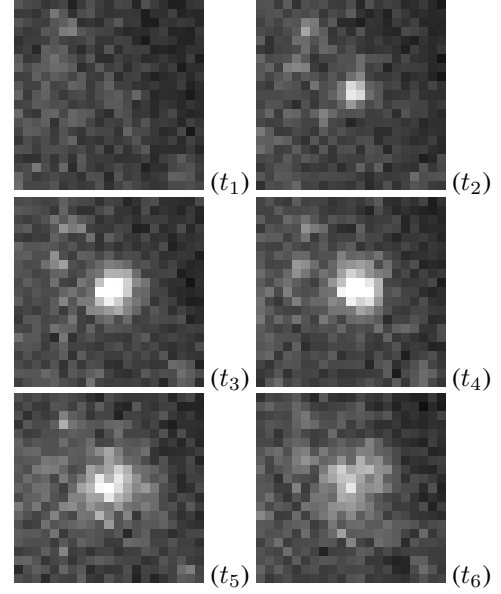


FIGURE 1 – Suite d’images, extraites d’une séquence d’images TIRF, montrant l’apparition du spot correspondant à une vésicule et son évolution progressive au cours de la fusion de la vésicule avec la membrane.

cours de la fusion de la vésicule.

Comme mentionné plus haut, le modèle SE-LDE prend en compte une libération progressive des protéines. Il est donc attendu qu’une protéine puisse rester à l’endroit de la fusion p_0 pendant un laps de temps moyen τ , que nous appellerons temps de résidence, après l’instant de fusion t_0 . Nous considérons ainsi une décroissance exponentielle de la concentration en protéines à l’intérieur de la vésicule, appelée concentration source. Notons $C(p, t)$ la concentration locale de protéine transmembranaire au point p à l’instant t . La libération continue des protéines produit un flux entre la composante de concentration source C_s , et la composante de concentration se diffusant C_d , avec $C = C_d + C_s$. La seconde loi de Fick [20], qui décrit la dynamique de fusion caractérisée par le coefficient de diffusion D , devient :

$$\frac{\partial C_d}{\partial t}(p, t) - D\Delta C_d(p, t) = -\frac{\partial C_s}{\partial t}(p, t), \quad (1)$$

avec une concentration de la source décroissant exponentiellement :

$$C_s(p, t) = C_0\delta(p - p_0)\exp(-\kappa(t - t_0)), \quad (2)$$

où $\kappa = 1/\tau$ est le taux de libération. Différentes dynamiques sous-jacentes peuvent conduire à une libération à décroissance exponentielle, comme une “échappée étroite” [25, 26], ou un processus de dissociation [16, 17].

D’après le principe de superposition, les équations (1) et

(2) conduisent au modèle de concentration suivant :

$$\begin{aligned} \mathcal{M}_C(p, t) = & \frac{A_0}{\sigma_{\text{PSF}}^2} \exp\left(-\kappa t - \frac{\|p - p_0\|_2^2}{2\sigma_{\text{PSF}}^2}\right) \\ & + \int_{t_0}^t \frac{\kappa A_0}{2D(t-u) + \sigma_{\text{PSF}}^2} \\ & \times \exp\left(-\kappa(u-t_0) - \frac{\|p - p_0\|_2^2}{4D(t-u) + 2\sigma_{\text{PSF}}^2}\right) du \end{aligned} \quad (3)$$

où A_0 est une constante reliée à la PSF du microscope et au nombre initial de protéines dans la vésicule. En fait, la seconde loi de Fick peut être résolue dans le domaine de Fourier, ce qui conduit à une solution analytique sous la forme d'une fonction de Green. En convoluant cette fonction de Green avec la PSF du microscope et la fonction de source (2), on obtient l'expression (3). Nous renvoyons le lecteur à [2] pour de plus amples détails mathématiques.

Nous avons montré dans [2] que l'équation (3) est également valide pour une source non ponctuelle, si le rayon de la vésicule est faible par rapport au rayon de la PSF (supposée gaussienne). Nous nous appuyerons sur cette hypothèse plus réaliste dans le reste du papier.

Une première justification de la pertinence de notre modèle SE-LDE est donnée à la figure 2. Nous utilisons le kymogramme pour visualiser le phénomène de fusion en un point donné de l'image. Le kymogramme est l'image obtenue en concaténant sur une ligne les valeurs d'intensité au point considéré, captées au cours du temps, pour une ligne (image XT) ou une colonne (image YT) de points de l'image. L'abscisse du kymogramme représente le temps. Il est évident que le kymogramme obtenu par simulation avec le modèle SE-LDE est nettement plus proche de celui reconstruit pour un cas réel, que le kymogramme obtenu par simulation pour une source ponctuelle et une libération instantanée.

4 Estimation des paramètres de libération et de diffusion

4.1 Détection des événements de fusion

Avant de pouvoir identifier le modèle SE-LDE, il nous faut détecter les événements de fusion des vésicules. Comme nous avons obtenu de bons résultats de détection d'événements de fusion dans [5], nous avons recours à la même méthode de détection, qui se fonde sur le détecteur ATLAS décrit dans [3] et appliqué à une séquence de cartes de différences temporelles d'intensité. Nous obtenons ainsi les localisations spatio-temporelles de la détection de chaque i ème événement de fusion $e_i = (p_{0i}, t_{0i})$. Soit N le nombre total d'événements de fusion détectés dans la séquence.

N volumes spatio-temporels élémentaires \mathcal{V}_i sont alors extraits autour des localisations e_i , dans lequel le fond de l'image, qui peut inclure des textures et d'autres spots statiques, est estimé puis soustrait à l'image comme expliqué

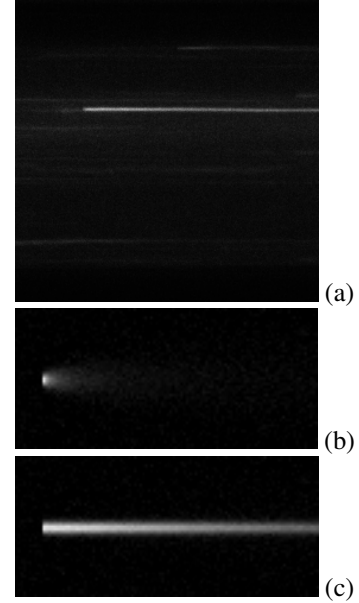


FIGURE 2 – Kymogrammes calculés en un point particulier pour respectivement de haut en bas : (a) une séquence d'images TIRF réelles, (b) une simulation (avec une taille d'image plus petite) à partir d'un modèle de source ponctuelle et libération instantanée, (c) et une simulation à partir de notre modèle SE-LDE.

dans [5]. Comme dans [5], nous choisissons des volumes \mathcal{V}_i de taille spatiale 21×21 pixels, mais d'horizon temporel plus étendu, à savoir vingt instants (de t_{0i} à $t_{0i} + 19$) au lieu de seulement cinq instants, afin d'améliorer la précision d'estimation des paramètres du modèle SE-LDE. Nous nous retrouvons avec un ensemble de N séries d'images reconstruites après élimination du fond de l'image, notées $\hat{z}_i, i = 1, \dots, N$, qui ne contiennent chacune qu'un spot central en fusion.

4.2 Estimation des paramètres du modèle SE-LDE

Il s'agit maintenant d'estimer les paramètres du modèle SE-LDE pour chacun des événements de fusion e_i détectés. Le modèle est défini par l'équation (3). Ces paramètres sont estimés à partir des intensités des images assimilées à des concentrations. Plus précisément, nous exploitons les images reconstruites $\hat{z}_i, i = 1 \dots N$, et nous avons à minimiser pour chaque événement détecté e_i le critère aux moindres carrés suivant :

$$\begin{aligned} \mathcal{J}(p_0, A_0, \sigma_{\text{PSF}}^2, \kappa, D) = & \\ & \sum_{p \in \mathcal{V}_i} \|\hat{z}_i(p, t) - \mathcal{M}_C(p, t)\|^2, \end{aligned} \quad (4)$$

où nous rappelons que \mathcal{V}_i désigne le volume élémentaire spatio-temporel défini autour de l'événement e_i . La minimisation de la fonctionnelle $\mathcal{J}(p_0, A_0, \sigma_{\text{PSF}}^2, \kappa, D)$ n'a pas de solution analytique explicite, mais peut être résolue nu-

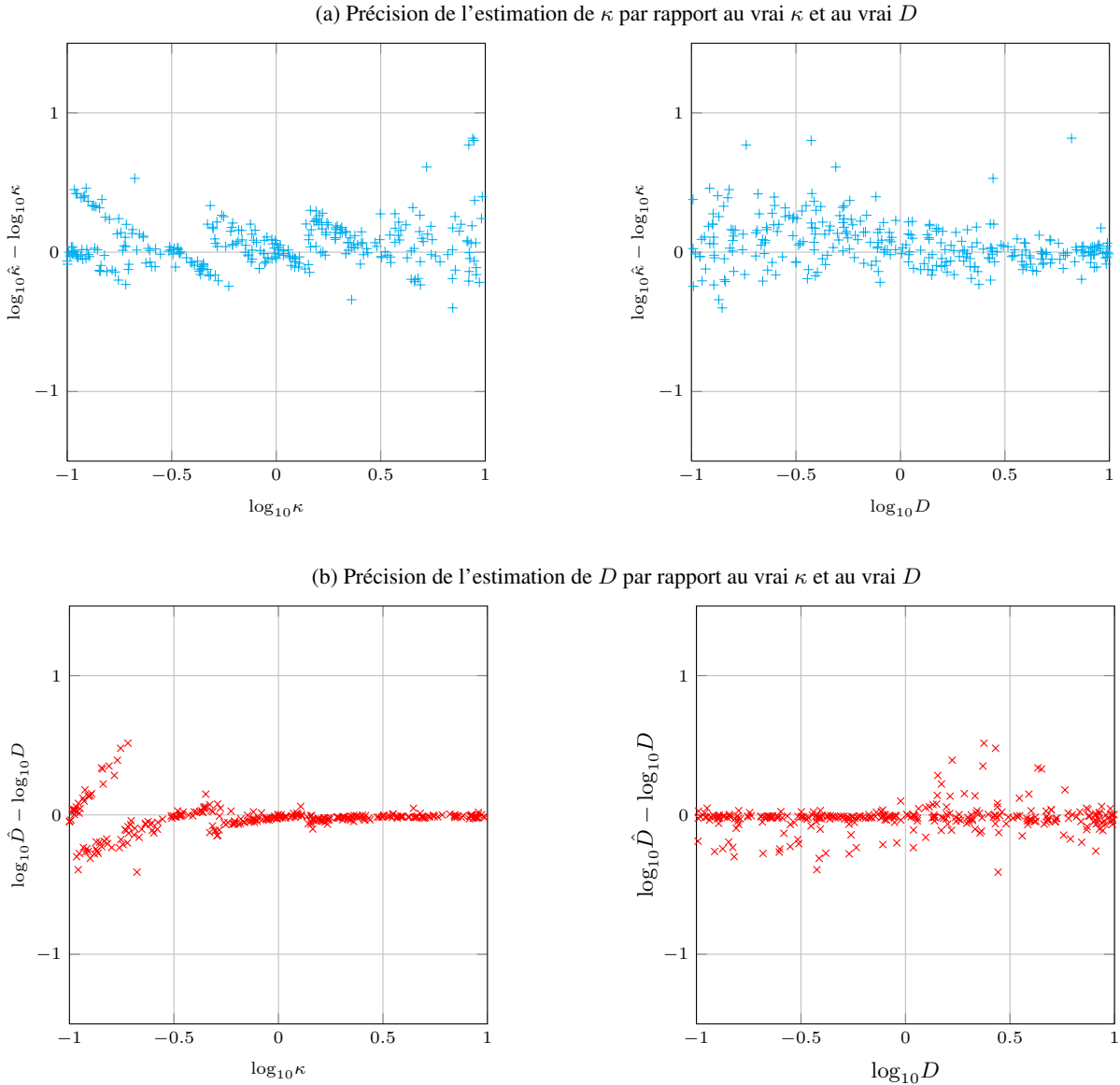


FIGURE 3 – Précision de l'estimation des paramètres biophysiques κ et D sur des séquences simulées avec le modèle SE-LDE, à gauche en fonction des valeurs de κ et à droite en fonction des valeurs de D , le tout en mode logarithmique décimal.

mériquement à l'aide d'un algorithme d'optimisation itératif.

Cependant, comme la partie spatiale du modèle d'intensité à t_0 est un spot gaussien, nous pouvons estimer de façon séparée et fiable les paramètres p_0 , A_0 et σ_{PSF}^2 en ajustant un modèle de spot gaussien sur une fenêtre spatiale autour de l'événement e_i dans l'image à l'instant t_0 . Pour p_0 , cela revient à une estimation plus précise que celle fournie par la détection initiale. De cette façon, les deux paramètres restants κ et D peuvent être estimés à travers une optimisation opérant en deux dimensions seulement. Il s'est avéré que l'algorithme de Gauss-Newton ne converge pas toujours vers le minimum global, aussi nous avons opté pour l'algorithme de Levenberg-Marquardt et le schéma de mise à jour de [18].

4.3 Initialisation

L'initialisation des paramètres, et en particulier l'initialisation de κ , a une influence certaine sur l'estimation. Au lieu d'estimer les deux paramètres κ_i et D_i une seule fois pour chaque événement de fusion détecté e_i , nous procédons à plusieurs optimisations correspondant à différentes initialisations des paramètres. Nous sélectionnons ensuite la solution qui minimise la somme des carrés des résidus. En pratique, un compromis devant être trouvé entre la précision voulue et le temps de calcul, nous avons choisi l'ensemble de valeurs initiales $\{0.1, 0.31, 1, 3.1, 10\}$ pour le paramètre κ , et l'ensemble de valeurs initiales $\{0.1, 10\}$ pour le paramètre D .

Afin que le résultat final ne soit pas affecté par la présence d'événements de fusion détectés de manière erronée dans

la phase préalable décrite au paragraphe 4.1, voire d'événements éventuellement mal estimés, nous appliquons un test de qualité d'ajustement du χ^2 avec un taux d'erreur de type I de 5%. En effet, nous préférons avoir un comportement de sur-détection initiale, puis nous servir de ce test pour éliminer les fausses détections.

5 Résultats expérimentaux

5.1 Evaluation quantitative sur données simulées

Pour évaluer la méthode d'estimation proposée, 300 séquences de 20 imageries de taille 21×21 pixels ont été générées avec des paramètres différents selon le modèle SELDE, pour imiter les imageries réelles \hat{z}_i . Pour cela, nous avons tiré aléatoirement des valeurs du coefficient de diffusion D entre 0, 1 et $10\text{px}^2/\text{T}$ (px désigne le pas de pixel et T la période de trame), et des valeurs de la variance de la PSF σ_{PSF}^2 entre 0, 5 et $1,5\text{px}^2$. Le taux de libération κ quant à lui varie entre 0.1 et 10T^{-1} . Le rapport signal-à-bruit s'étage de 1 à 10.

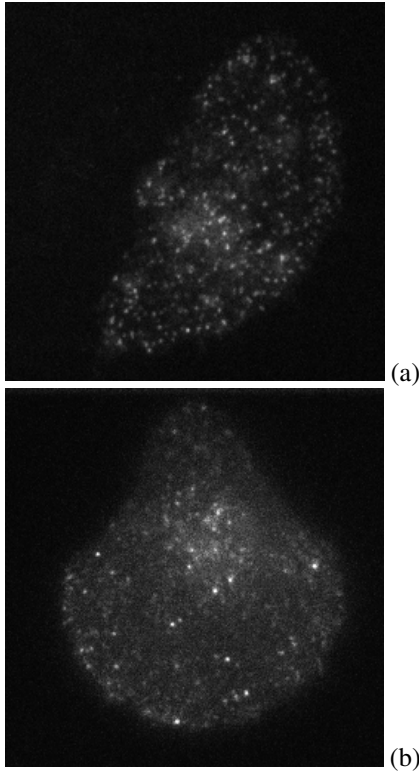


FIGURE 4 – Exemple d'images réelles de microscopie TIRF (cellules patternées) : (a) l'image du haut correspond à des protéines TfR, (b) l'image du bas à des protéines Langerin.

Les erreurs logarithmiques sur l'estimation de κ et D sont tracées à la figure 3 pour les 300 séquences. L'estimation de κ est moins précise que celle de D , mais nous verrons à la section 5.2 que la précision est largement suffisante pour extraire des informations pertinentes à par-

tir d'images réelles de microscopie TIRF. En outre, de grandes erreurs sont très rares. Les effets de structure (alignements obliques descendants) pouvant être perçus sur le premier graphique de la figure 3 sont dus à des estimations bloquées dans un même minimum local, lié à l'initialisation, pour un groupe de valeurs de κ , κ étant le paramètre le plus compliqué à estimer. Sur les 300 séquences testées, seulement 5 produisent une erreur logarithmique absolue supérieure à 0,5. L'erreur logarithmique absolue moyenne (MALE en anglais) est faible, elle est égale à 0,12.

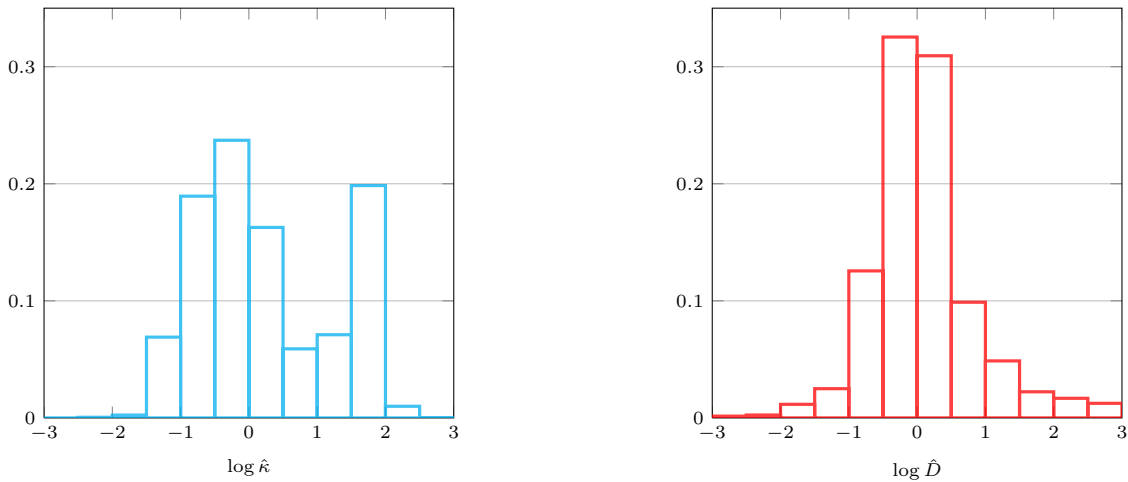
En ce qui concerne l'estimation de D , les résultats fournis à la figure 3 sont très bons lorsque le taux κ est suffisamment élevé. Ce comportement n'est pas une surprise, étant donné que, pour un taux de libération faible, le flux entre les concentrations C_s et C_d est faible. Par conséquent, peu de protéines sont alors disponibles pour estimer D (précisément celles qui subissent un mouvement brownien). Au contraire, quand le taux κ croît, l'estimation du coefficient de diffusion D devient de plus en plus précise, comme la quantité de protéines pour estimer D augmente. Lorsque $\kappa > 0,25$, avec une valeur de MALE de 0,03, l'estimation de D est très précise. En incluant les pires estimations, la valeur MALE globale pour le coefficient de diffusion reste très faible à 0,06.

5.2 Comparaison des dynamiques des protéines TfR et Langerin sur images réelles

Nous avons appliqué notre méthode à 16 séquences d'images réelles de microscopie TIRF représentant des cellules où respectivement les protéines TfR et Langerin ont été taguées pour être visibles par fluorescence. Un exemple en est donné à la figure 4. Huit premières séquences concernent la protéine TfR, et les huit suivantes la protéine Langerin. Dans l'ensemble des séquences correspondant à la protéine TfR, 3 147 événements de fusion ont été détectés, et dans celles associées à la protéine Langerin, 4 223 événements de fusion ont été repérés.

Les résultats sont rassemblés au sein de la figure 5 sous la forme de quatre histogrammes des logarithmes des valeurs $\hat{\kappa}_i$ et \hat{D}_i estimées sur les ensembles de séquences correspondant respectivement aux deux protéines étudiées. Les histogrammes de $\log \hat{\kappa}_i$ ont des formes très différentes selon qu'il s'agit de la protéine TfR ou de la protéine Langerin. Bien que le premier mode soit à environ 1T^{-1} pour les deux protéines, l'histogramme pour la TfR présente un second pic fort autour de 100T^{-1} , qui n'existe pas dans l'histogramme associé à la Langerin. Ce second pic contient jusqu'à 20% des événements de fusion de TfR détectés. En revanche, beaucoup plus d'événements à libération lente se trouvent dans des séquences de Langerin, autour $0,1\text{T}^{-1}$. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés dans [10], dans lequel un simple signal temporel 1D d'intensité a été utilisé pour classer qualitativement les événements de fusion en deux catégories, lent et rapide. Cependant, notre modèle et notre méthode d'estimation associée fournissent une description considérablement enrichie du processus de

(a) TfR (histogrammes calculés sur 8 séquences)



(b) Langerin (histogrammes calculés sur 8 séquences)

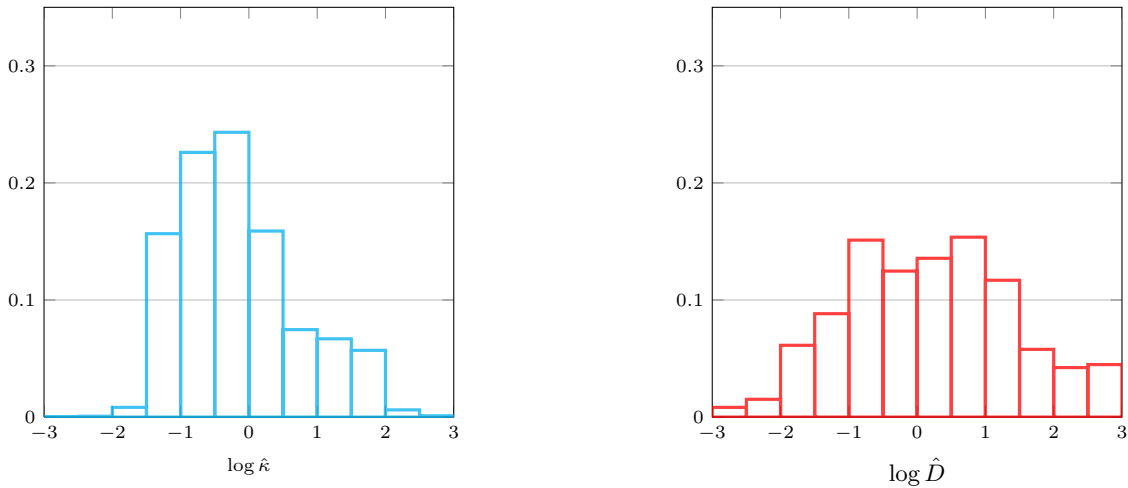


FIGURE 5 – Comparaison des histogrammes des log-valeurs des paramètres biophysiques κ (à gauche) et D (à droite), estimées sur huit séquences d’images TIRF correspondant respectivement (a) à la protéine TfR, et (b) à la protéine Langerin

fusion. Nous fournissons les estimations des deux paramètres biophysiques κ et D , et la distribution complète des valeurs de ces paramètres biophysiques.

Une seconde conclusion peut être tirée en ce qui concerne les statistiques du coefficient de diffusion. En effet, la Langerin montre une dispersion beaucoup plus grande des estimations des \hat{D}_i que la protéine TfR. À notre connaissance, cela n’a jamais été mis en évidence dans le cadre de la fusion des vésicules, et ne pouvait même pas être analysé dans les travaux précédents [4, 8, 10]. Dans [10], le coefficient de diffusion n’est pas estimé, tandis que le modèle utilisé dans [4, 8, 5] était trop simple pour appréhender les événements à libération lente. De plus, comme indiqué dans [5], même pour des événements à libération rapide, l’estimation du coefficient de diffusion n’est pas assez précise dans [4, 8].

6 Conclusion

Nous avons proposé un modèle dynamique original nommé SE-LDE pour représenter la fusion des vésicules à la membrane plasmique à la fin du processus d’exocytose. Il comprend deux paramètres biophysiques, à savoir le taux de libération des protéines et le coefficient de diffusion. Nous avons développé une méthode d’identification de ce modèle directement à partir de séquences d’images reconstruites sans le fond de l’image autour des événements de fusion préalablement détectés. Après avoir démontré l’efficacité et la précision de notre méthode sur des séquences simulées, nous l’avons appliquée avec succès à des séquences d’images réelles de microscopie TIRF représentant des cellules où respectivement les protéines TfR et Langerin sont visualisées par fluorescence. Les expériences ont montré que les distributions du taux de libéra-

tion et du coefficient de diffusion pour ces deux protéines transmembranaires présentent des caractéristiques particulières qui devront être interprétées plus avant par des études biologiques complémentaires.

Afin d'améliorer encore la fiabilité de notre méthode, plusieurs évolutions pourraient être étudiées. Tout d'abord, comme nous l'avons vu, il arrive que l'estimation des paramètres biophysiques soit bloquée dans un minimum local. Pour y remédier, nous envisageons deux pistes d'amélioration : *i*) le recours à un estimateur robuste au lieu des moindres carrés de (4); *ii*) l'adaptation automatique des voisinages \mathcal{V}_i aux données. Cette seconde amélioration pourrait permettre également d'obtenir des estimations de D plus fiables et plus précises lorsque κ est faible, situation pour laquelle un intervalle temporel plus long s'avérerait plus judicieux. Par ailleurs, cette approche pourrait être étendue à d'autres protéines associées à la fusion membranaire, comme la protéine Rab11. Cette dernière, non transmembranaire, n'est pas confinée à la membrane et suit une trajectoire tridimensionnelle dans le cytosol. Nous devrions donc étendre notre méthode à des séquences d'images en trois dimensions. Cette possibilité est offerte par la microscopie TIRF multi-angles [6] qui peut acquérir de telles images avec un échantillonnage temporel suffisamment fin pour étudier des dynamiques de fusion rapides.

Remerciements

Ce travail a reçu le soutien de la Région Bretagne à travers le cofinancement de la thèse de Antoine Basset, et celui de France BioImaging (ANR, Programme Investissements d'Avenir) pour le financement partiel de la grille de calcul utilisée dans les expérimentations.

Références

- [1] P. F. F. Almeida and W. L. C. Vaz. Lateral diffusion in membranes. *Handbook of Biological Physics*, 1 :305–357, 1995.
- [2] A. Basset. *Detection and characterization of dynamical events in image sequences with local approaches : Application to membrane fusion in TIRF microscopy*. PhD thesis, Université de Rennes 1, Dec. 2015.
- [3] A. Basset, J. Boulanger, P. Bouthemy, C. Kervrann, and J. Salamero. Adaptive spot detection with optimal scale selection in fluorescence microscopy images. *IEEE Trans. Image Processing*, 24(11) :4512–4527, Nov. 2015.
- [4] A. Basset, P. Bouthemy, J. Boulanger, J. Salamero, and C. Kervrann. Detection and classification of dynamic subcellular events in TIRF microscopy sequences. In *IEEE ISBI*, Beijing, Apr. 2014.
- [5] A. Basset, P. Bouthemy, J. Boulanger, F. Waharte, C. Kervrann, and J. Salamero. Detection and estimation of membrane diffusion events during exocytosis in TIRFM image sequences. In *IEEE ISBI*, New York City, Apr. 2015.
- [6] J. Boulanger, C. Gueudry, D. Münch, B. Cinquin, P. Paul-Gilloteaux, S. Bardin, C. Guérin, F. Senger, L. Blanchoin, and J. Salamero. Fast high-resolution 3D total internal reflection fluorescence microscopy by incidence angle scanning and azimuthal averaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(48) :17164–17169, 2014.
- [7] D. Brown. Imaging protein trafficking. *Nephron Experimental Nephrology*, 103(2) :e55–e61, 2006.
- [8] J. G. Burchfield, J. A. Lopez, K. Mele, P. Valloton, and W. E. Hughes. Exocytotic vesicle behaviour assessed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Traffic*, 11(4) :429–439, 2010.
- [9] R. J. Cherry. Rotational and lateral diffusion of membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 559(4) :289–327, 1979.
- [10] B. Cinquin. *Étude dynamique en microscopie du rôle de Rab11a et de ses partenaires dans le recyclage des endosomes vers la membrane plasmique*. PhD thesis, Université Paris 7, 2011.
- [11] R. M. Clegg and W. L. C. Vaz. Translational diffusion of proteins and lipids in artificial lipid bilayer membranes : A comparison of experiment with theory. *Progress in Protein-Lipid Interactions*, 1 :173–229, 1985.
- [12] C. Di Rienzo, E. Gratton, F. Beltram, and F. Cardarelli. Fast spatiotemporal correlation spectroscopy to determine protein lateral diffusion laws in live cell membranes. *Biophysical J.*, 106(2) :224a, 2014.
- [13] A.J. García-Sáez, D.C. Carrer, and P. Schwille. Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and organization in giant unilamellar vesicles. In *Liposomes*, 606 :493–508, Springer, 2010.
- [14] B. Hebert, S. Costantino, and P.W. Wiseman. Spatiotemporal image correlation spectroscopy (STICS) theory, verification, and application to protein velocity mapping in living CHO cells. *Biophysical Journal*, 88(5) :3601–3614, 2005.
- [15] N. Hozé, D. Nair, E. Hosy, C. Sieben, S. Manley, A. Herrmann, J.-B. Sibarita, D. Choquet, and D. Holcman. Heterogeneity of AMPA receptor trafficking and molecular interactions revealed by superresolution analysis of live cell imaging. *PNAS*, 109(42) :17052–17057, 2012.
- [16] K.-B. Im, U. Schmidt, M.-S. Kang, J.-Y. Lee, F. Bestvater, and M. Wachsmuth. Diffusion and binding analyzed with combined point FRAP and FCS. *Cytometry Part A*, 83(9) :876–889, 2013.
- [17] A. Michelman-Ribeiro, D. Mazza, T. Rosales, T. J. Stasevich, H. Boukari, V. Rishi, C. Vinson, J. R.

- Knutson, and J. G. McNally. Direct measurement of association and dissociation rates of DNA binding in live cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical J.*, 97(1) :337–346, 2009.
- [18] H.B. Nielsen. Damping parameter in Marquardt’s method. Technical Report IMM-REP-1999-05, IMM, Technical University of Denmark, 1999.
- [19] Y. Ohsugi, K. Saito, M. Tamura, and M. Kinjo. Lateral mobility of membrane-binding proteins in living cells measured by total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical J.*, 91(9) :3456–3464, 2006.
- [20] J. Philibert. One and a half century of diffusion : Fick, Einstein, before and beyond. *Diffusion Fundamentals*, 2(1) :1–10, 2005.
- [21] K. Prydz, H. Tveit, A. Vedeler, and J. Saraste. Arrivals and departures at the plasma membrane : Direct and indirect transport routes. *Cell and Tissue Research*, 352(1) :5–20, 2013.
- [22] Y. Sako and A. Kusumi. Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *J. Cell Biology*, 125(6) :1251–1264, 1994.
- [23] M. J. Saxton and K. Jacobson. Single-particle tracking : Applications to membrane dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 26(1) :373–399, 1997.
- [24] I. F. Sbalzarini and P. Koumoutsakos. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *J. Structural Biology*, 151(2) :182–195, 2005.
- [25] Z. Schuss. The narrow escape problem – a short review of recent results. *J. Scientific Computing*, 53(1) :194–210, 2012.
- [26] Z. Schuss, A. Singer, and D. Holcman. The narrow escape problem for diffusion in cellular microdomains. *PNAS*, 104(41) :16098–16103, 2007.
- [27] S. Seiffert and W. Oppermann. Systematic evaluation of FRAP experiments performed in a confocal laser scanning microscope. *J. Microscopy*, 220(1) :20–30, 2005.
- [28] R. Swaminathan, C. P. Hoang, and A. S. Verkman. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells : Cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophysical J.*, 72(4) :1900–1907, 1997.