

# BIOMED - TP 2

## Colocalization

Lucie Jandet & Marie Diez

### 1 A - Generate 2 pairs of images

A partir des images *Sequence1\_coloc* et *Sequence2\_coloc* on peut generer 2 pairs d'image avec une simulation de colocalisation grâce à l'outil *Colocalization Simulator*.

Nous avons tester avec les paramètres suivant :

- Percentage of colocalization : 0.01
- Percentage of colocalization : 0.2
- Percentage of colocalization : 0.9

Avec 1px de distance moyenne de colocalisation.

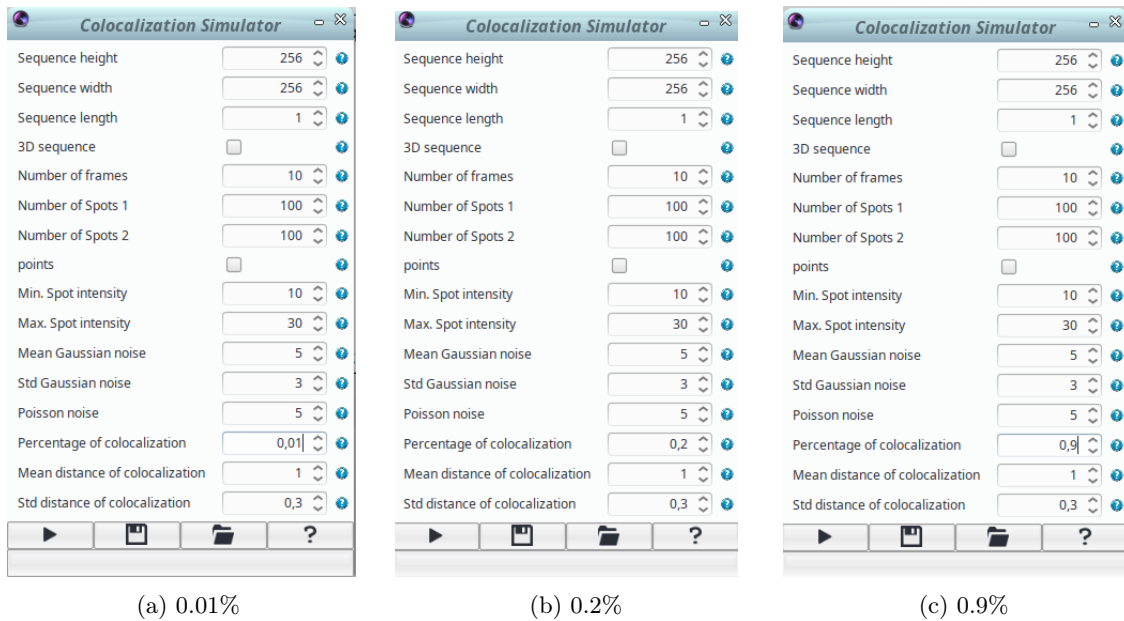


Figure 1: Percentage of colocalization

## 1.1 Percentage of colocalization : 0.01

### 1.1.1 Pixel-Based correlation

Colocalization Studio

Correlation methods are reviewed in  
Lagache, T. et al. Statistical analysis of molecule colocalization in bioimaging.  
Cytometry Part A, 87(6), 568-579. (2015)

METHOD (CORRELATION or OBJECT) **CORRELATION**

Select ROIs manually ?

Reset ROIs

Sequences used for analysis

Sequence 1 **Sequence 1**

Channel 1 0

Sequence 2 **Sequence 2**

Channel 2 0

Spot detections (Overlap, Manders & Ripley analysis)

Detections1 **detections of Sequence 1**

Detections2 **detections of Sequence 2**

Threshold (T) for overlap analysis 0,5

Nb of MC simulations (p-value computation) 10

Export

Export to Excel ☐

**Pearson Analysis: Results**

Pearson R 0.0

p-value Pearson (closed formula) 0.73

log p-value Pearson -0.13

**Cross-Correlation Analysis: Results**

Cross-Correlation 1 0.0

Cross-Correlation 2 0.0

**Manders Analysis: Results**

Manders M1 0.02

Manders M2 0.01

M1 (Mean of simulations) 0.01

M2 (Mean of simulations) 0.01

p-value Manders 1 (MC simulations) 0.4

log p-value Manders 1 -0.4

p-value Manders 2 (MC simulations) 0.4

log p-value Manders 2 -0.4

**Overlap (>T) Analysis: Results**

Overlap 1 (% (1 overlap 2) > Threshold) 0.0

Overlap 2 (% (2 overlap 1) > Threshold) 0.0

Overlap 1 (Mean of simulations) 0.01

Overlap 2 (Mean of simulations) 0.01

p-value Overlap 1 (MC simulations) 0.9

log p-value Overlap 1 -0.05

p-value Overlap 2 (MC simulations) 0.9

log p-value Overlap 2 -0.05

(a)

Figure 2: Pixel-based correlation

- Pearson analysis

On peut voir que le coefficient de pearson est un coefficient de corrélation, on peut voir ici qu'il est de 0, ce qui a du sens étant donné que le pourcentage de colocalisation simulé est de 0.1%, le log p-value est relativement faible ce qui indique un résultat fiable.

- Cross-correlation analysis

On peut voir que la cross corrélation de 0 ici indique qu'aucune corrélation n'a été détectée, ce qui a toujours du sens vu que le pourcentage de colocalisation est très faible.

- Manders analysis

Le coefficient de Manders est rapporté aux données dites pertinentes, on supprime du calcul tous ce qui ne concerne pas le signal qui nous intéresse, c'est pour cela que souvent on retrouve des valeurs plus élevées avec ce coefficient plutôt qu'avec pearson par exemple. Cependant vu que la simulation indique un très faible niveau de colocalisation, ici le résultat est très faible aussi.

- Overlap analysis

On peut voir un taux d'overlap très faible ce qui est normal dans ce cas là, étant donné que la

colocalisation étant le degré d'overlap entre 2 labels.

1.1.2 Object-Based correlation

For more information:  
Parametric: Lagache, T. et al. Cytometry Part A, 87(6), 568-579. (2015)  
SODA: Lagache, T. et al. Nature Communications, 9(1), 698. (2018)

METHOD (CORRELATION or OBJECT) **OBJECT**

Select ROIs manually ?

Reset ROIs

Sequences used for analysis

Sequence 1 **Sequence 1**

Channel 1 0

Sequence 2 **Sequence 2**

Channel 2 0

Spot detections (Overlap, Manders & Ripley analysis)

Detections1 **detections of Sequence 1**

Detections2 **detections of Sequence 2**

Parameters for Ripley analysis

Maximal distance for the analysis (in pxs) 5

Step (in pxs) 1

Plot K function graph to check the fit ☒

Export

Export colocalized detections (ROIs) ☐

Export to Excel ☐

Distance analysis (center of mass 1 inside masks 2)

% of spots 2 (center of mass) inside spots 1 masks 0.01

p-value spots 1 inside 2 (closed formula) 0.75

log p-value spots 1 inside 2 -0.12

Ripley's analysis (parametric)

% of coloc. spots 2 0.01

Mean coloc. distance (pixels) 2.05

Ripley's analysis (soda)

% of spots 2 coloc. with spots 1 0.03

Mean colocalization distance (SODA) (pixels) 2.54

p-value SODA (closed formula) 0.1

log p-value SODA -0.98

(a)

Figure 3: Quantitative results

The figure is a line graph titled "Ripley's K function step". The x-axis is labeled "pixels" and ranges from 0.0 to 5.2 with increments of 0.2. The y-axis ranges from -0.13 to 0.05 with increments of 0.01. There are two data series: a red line representing "Y" (the observed K function) and a blue line representing "Y fit" (the expected K function under the null hypothesis). The red line starts at (0,0), drops sharply to a minimum of approximately -0.125 at x=1.0, then rises to a peak of approximately 0.045 at x=3.0, and finally levels off around 0.015 for x > 4.0. The blue line starts at (0,0), remains near zero until x=2.0, then rises to a peak of approximately 0.03 at x=3.0, and levels off around 0.015 for x > 4.0. A legend at the bottom indicates "Y" in red and "Y fit" in blue.

(a)

Figure 4: Ripley's K function

3

- Distance analysis  
On peut bien voir avec l'analyse de distance un pourcentage de spots 2 inside spots 1 (colocalisation) équivalent à notre pourcentage de colocalisation simulé, avec une faible p-value ce qui indique un résultat fiable.
- Ripley's analysis  
Avec l'analyse de Ripley on peut retrouver le taux exacte de colocalisation avec une distance moyenne de 2 pixel, un peu supérieur à notre valeur de référence de 1 pixel.

## 1.2 Percentage of colocalization : 0.2

### 1.2.1 Pixel-Based correlation

Correlation methods are reviewed in  
Lagache, T. et al. Statistical analysis of molecule colocalization in bioimaging.  
Cytometry Part A, 87(6), 568-579. (2015)

METHOD (CORRELATION or OBJECT) **CORRELATION**

Select ROIs manually ?

Reset ROIs

Sequences used for analysis

Sequence 1 **Sequence 1**

Channel 1 **0**

Sequence 2 **Sequence 2**

Channel 2 **0**

Spot detections (Overlap, Manders & Ripley analysis)

Detections1 **detections of Sequence 1**

Detections2 **detections of Sequence 2**

Threshold (T) for overlap analysis **0,5**

Nb of MC simulations (p-value computation) **10**

Export

Export to Excel ☐

Pearson Analysis: Results

Pearson R **0.05**

p-value Pearson (closed formula) **0.0**

log p-value Pearson **-40.68**

Cross-Correlation Analysis: Results

Cross-Correlation 1 **0.05**

Cross-Correlation 2 **0.05**

Manders Analysis: Results

Manders M1 **0.13**

Manders M2 **0.12**

M1 (Mean of simulations) **0.02**

M2 (Mean of simulations) **0.01**

p-value Manders 1 (MC simulations) **0.0**

log p-value Manders 1 **0.0**

p-value Manders 2 (MC simulations) **0.0**

log p-value Manders 2 **0.0**

Overlap (>T) Analysis: Results

Overlap 1 (% (1 overlap 2) > Threshold) **0.15**

Overlap 2 (% (2 overlap 1) > Threshold) **0.15**

Overlap 1 (Mean of simulations) **0.01**

Overlap 2 (Mean of simulations) **0.01**

p-value Overlap 1 (MC simulations) **0.0**

log p-value Overlap 1 **0.0**

p-value Overlap 2 (MC simulations) **0.0**

log p-value Overlap 2 **0.0**

(a)

Figure 5: Pixel-based correlation

- Pearson analysis  
On peut voir que le coefficient de pearson ne fournis pas une très bonne estimation.
- Cross-correlation analysis  
La cross-correlation non plus.
- Manders analysis

Le coefficient de Manders cependant ayant supprimer du calcule tout ce qui ne nous interesse pas fournis une bien meilleur estimation de colocalisation même si elle n'est pas parfaite.

- Overlap analysis

On peut voir un taux d'overlap de 15% ce qui se rapproche de notre simulation à 20%.

### 1.2.2 Object-Based correlation

For more information:  
 Parametric: Lagache, T. et al. Cytometry Part A, 87(6), 568-579. (2015)  
 SODA: Lagache, T. et al. Nature Communications, 9(1), 698. (2018)

METHOD (CORRELATION or OBJECT) **OBJECT**

Select ROIs manually? ☐

Reset ROIs

▼ Sequences used for analysis

Sequence 1 **Sequence 1**

Channel 1 **0**

Sequence 2 **Sequence 2**

Channel 2 **0**

▼ Spot detections (Overlap, Manders & Ripley analysis)

Detections1 **detections of Sequence 1**

Detections2 **detections of Sequence 2**

▼ Parameters for Ripley analysis

Maximal distance for the analysis (in pxs) **5**

Step (in pxs) **1**

Plot K function graph to check the fit ☒

▼ Export

Export colocalized detections (ROIs) ☐

Export to Excel ☐

▼ Distance analysis (center of mass 1 inside masks 2)

% of spots 2 (center of mass) inside spots 1 masks **0.11**

p-value spots 1 inside 2 (closed formula) **0.0**

log p-value spots 1 inside 2 **-9.2**

▼ Ripley's analysis (parametric)

% of coloc. spots 2 **0.16**

Mean coloc. distance (pixels) **1.3**

▼ Ripley's analysis (soda)

% of spots 2 coloc. with spots 1 **0.15**

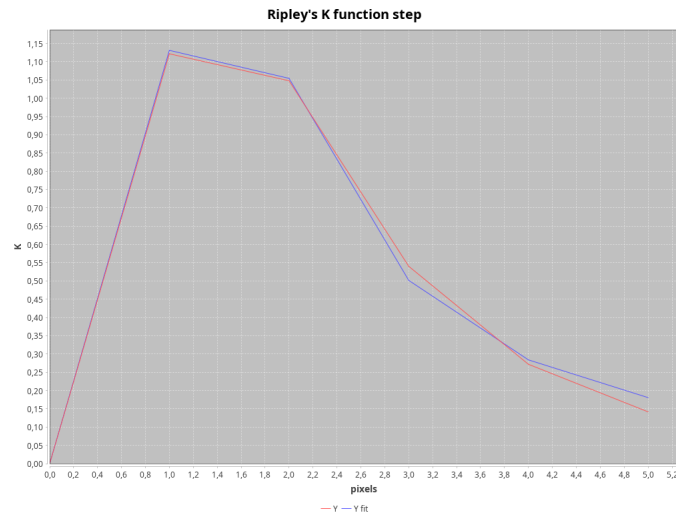
Mean colocalization distance (SODA) (pixels) **1.35**

p-value SODA (closed formula) **0.0**

log p-value SODA **-18.29**

(a)

Figure 6: Quantitative results



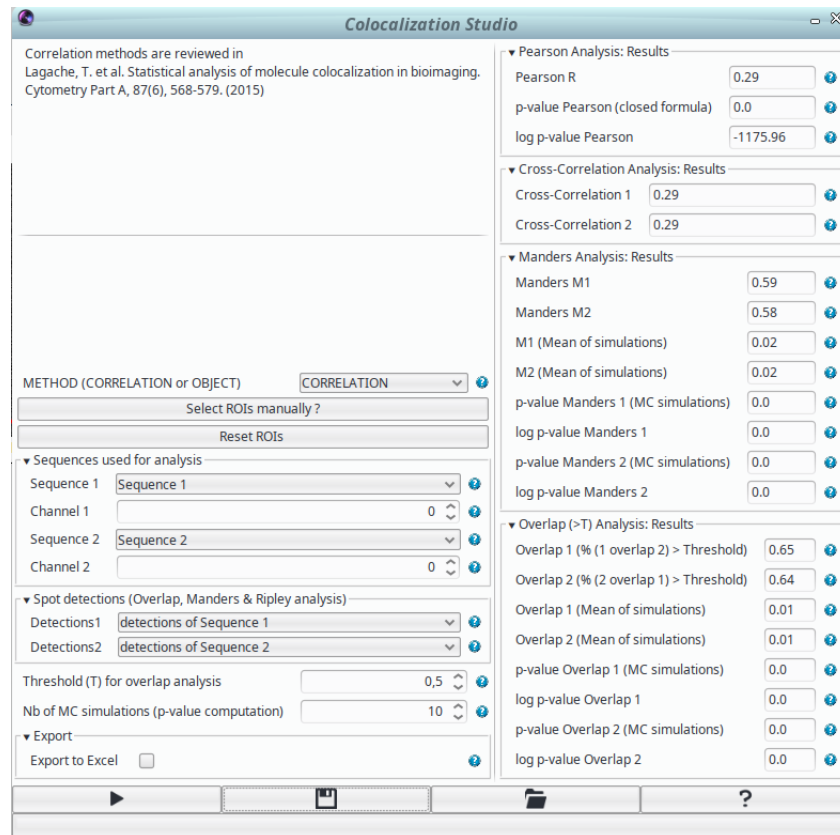
(a)

Figure 7: Ripley's K function

- Distance analysis  
On peut voir avec l'analyse de distance un pourcentage de spots 2 insides spots 1 (colocaliastion) un peu inférieur à notre simulation de 0.2
- Ripley's analysis  
L'analyse de Ripley trouve un résultat plus proche de ce que l'on attend, avec une distance moyenne de 1.3 pixel ce qui est proche de notre valeur de référence de 1 pixel.

## 1.3 Percentage of colocalization : 0.9

### 1.3.1 Pixel-Based correlation



(a)

Figure 8: Pixel-based correlation

- **Pearson analysis**  
On peut voir que le coefficient de pearson ne fournis pas une très bonne estimation. Mais cependant possède une p-value faible.
- **Cross-correlation analysis**  
La cross-correlation est reativement faible aussi.
- **Manders analysis**  
Le coefficient de Manders cependant ayant supprimer du calcule tout ce qui ne nous interesse pas fournis une bien meilleur estimation de colocalisation même si elle n'est pas parfaite.
- **Overlap analysis**  
On peut voir un taux d'overlap de 65% ce qui est assez éloigné de notre simulation à 90%.

### 1.3.2 Object-Based correlation

- **Distance analysis**  
On peut voir avec l'analyse de distance un pourcentage de spots 2 insides spots 1 (colocaliastion) un peu inférieur à notre simulation de 0.9
- **Ripley's analysis**  
L'analyse de Ripley trouve un résultat plus proche de ce que l'on attend, avec une colocalisation de 0.83 et une distance moyenne de 1.2 pixel.

For more information:  
 Parametric: Lagache, T. et al. Cytometry Part A, 87(6), 568-579. (2015)  
 SODA: Lagache, T. et al. Nature Communications, 9(1), 698. (2018)

METHOD (CORRELATION or OBJECT) **OBJECT**

Select ROIs manually?

Reset ROIs

▼ Sequences used for analysis

Sequence 1 **Sequence 1**

Channel 1 **0**

Sequence 2 **Sequence 2**

Channel 2 **0**

▼ Spot detections (Overlap, Manders & Ripley analysis)

Detections1 **detections of Sequence 1**

Detections2 **detections of Sequence 2**

▼ Parameters for Ripley analysis

Maximal distance for the analysis (in pxs) **5**

Step (in pxs) **1**

Plot K function graph to check the fit ☒

▼ Export

Export colocalized detections (ROIs) ☐

Export to Excel ☐

▼ Distance analysis (center of mass 1 inside masks 2)

% of spots 2 (center of mass) inside spots 1 masks **0.63**

p-value spots 1 inside 2 (closed formula) **0.0**

log p-value spots 1 inside 2 **78.66**

▼ Ripley's analysis (parametric)

% of coloc. spots 2 **0.8**

Mean coloc. distance (pixels) **1.1**

▼ Ripley's analysis (soda)

% of spots 2 coloc. with spots 1 **0.8**

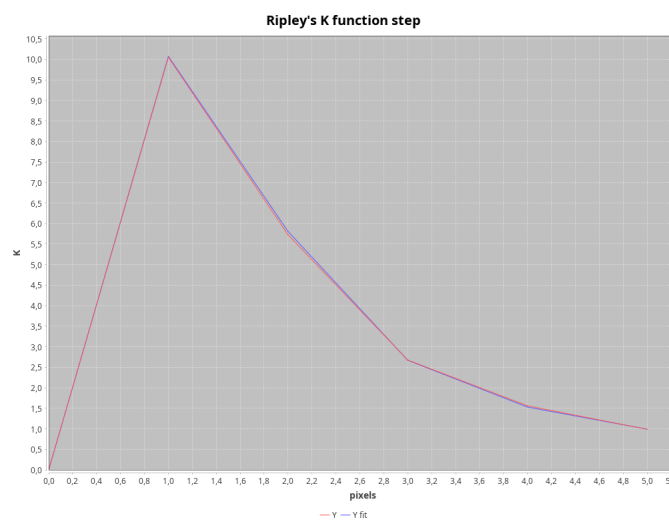
Mean colocalization distance (SODA) (pixels) **1.17**

p-value SODA (closed formula) **0.0**

log p-value SODA **-523.94**

(a)

Figure 9: Quantitative results



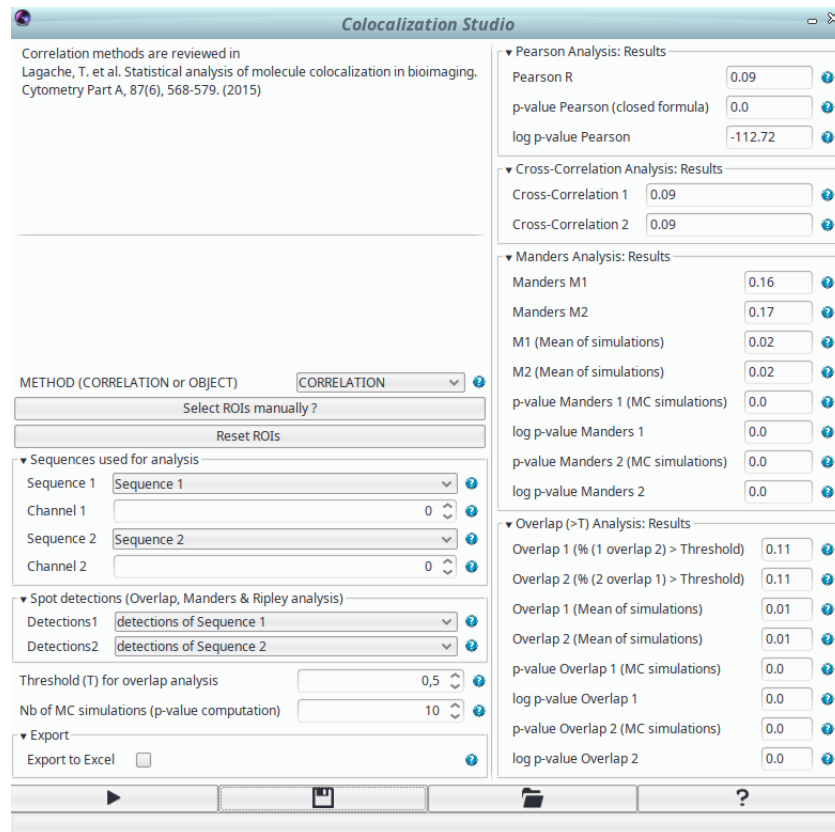
(a)

Figure 10: Ripley's K function



## 2 B - Compute the colocalisation of the sequences sequence01\_coloc.tif and sequence02\_coloc.tif

### 2.1 Pixel-Based correlation



(a)

Figure 11: Pixel-based correlation

- **Pearson analysis**  
On peut voir que le coefficient de pearson fournis un résultat faible de 0.09 avec une p-value faible ce qui signifie que le résultat est fiable.
- **Cross-correlation analysis**  
La cross-correlation est relativement faible aussi.
- **Manders analysis**  
Le coefficient de Manders cependant ayant supprimer du calcule tout ce qui ne nous interesse pas fournis donc une valeur plus élevé de colocalisation.
- **Overlap analysis**  
On peut voir un taux d'overlap de 11%.

### 2.2 Object-Based correlation

- **Distance analysis**  
On peut voir avec l'analyse de distance un pourcentage de spots 2 insides spots 1 (colocaliation) de 0.12 mais avec un p-value relativement élevée.
- **Ripley's analysis**  
L'analyse de Ripley trouve un résultat un peu différent de 0.28 avec une distance moyenne de 1.85

For more information:  
 Parametric: Lagache, T. et al. Cytometry Part A, 87(6), 568-579. (2015)  
 SODA: Lagache, T. et al. Nature Communications, 9(1), 698. (2018)

METHOD (CORRELATION or OBJECT) **OBJECT**

Select ROIs manually ?  
 Reset ROIs

▼ Sequences used for analysis  
 Sequence 1 **Sequence 1**  
 Channel 1 **0**  
 Sequence 2 **Sequence 2**  
 Channel 2 **0**

▼ Spot detections (Overlap, Manders & Ripley analysis)  
 Detections1 **detections of Sequence 1**  
 Detections2 **detections of Sequence 2**

▼ Parameters for Ripley analysis  
 Maximal distance for the analysis (in pxs) **5**  
 Step (in pxs) **1**  
 Plot K function graph to check the fit ☒

▼ Export  
 Export colocalized detections (ROIs) ☐  
 Export to Excel ☐

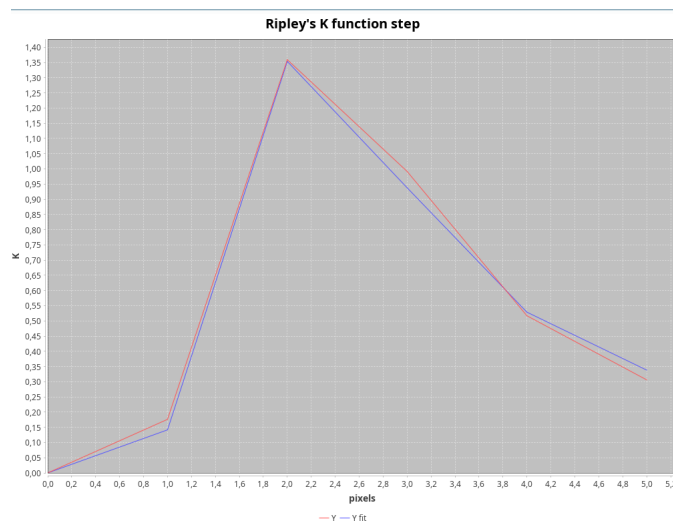
▼ Distance analysis (center of mass 1 inside masks 2)  
 % of spots 2 (center of mass) inside spots 1 masks **0.12**  
 p-value spots 1 inside 2 (closed formula) **0.0**  
 log p-value spots 1 inside 2 **10.27**

▼ Ripley's analysis (parametric)  
 % of coloc. spots 2 **0.28**  
 Mean coloc. distance (pixels) **1.85**

▼ Ripley's analysis (soda)  
 % of spots 2 coloc. with spots 1 **0.29**  
 Mean colocalization distance (SODA) (pixels) **2.07**  
 p-value SODA (closed formula) **0.0**  
 log p-value SODA **-46.62**

(a)

Figure 12: Quantitative results



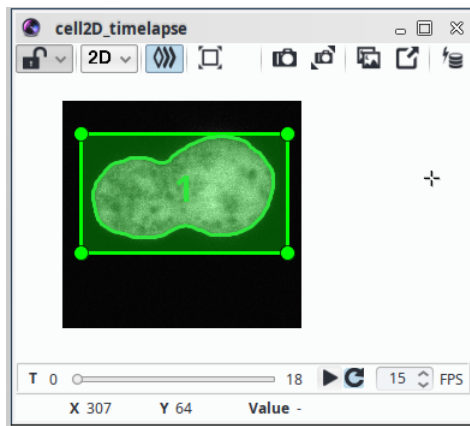
(a)

Figure 13: Ripley's K function

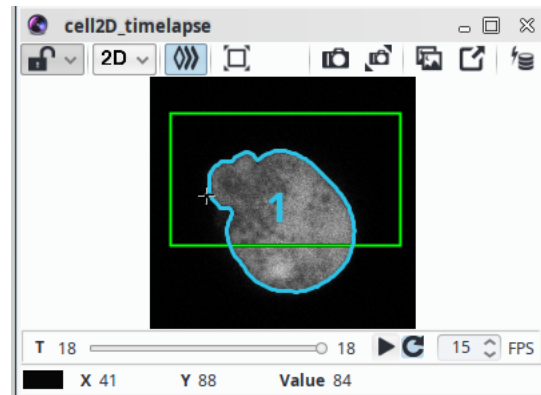
pixel.

### 3 Deformable model

On peut utiliser les modèles déformable pour segmenter une particule sur une image ou une sequence d'images :



(a) Segmentation 1



(b) 0.2%

Figure 14: Segmentation 2

## 4 Protocol to extract red spot

Voici un protocol pour extraire les spots rouges :

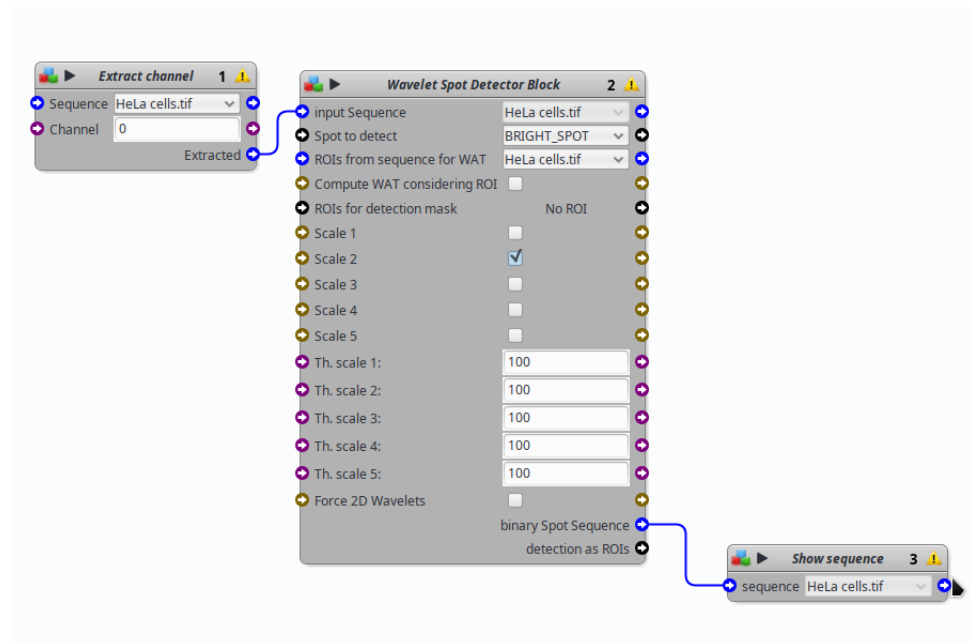


Figure 15: Protocol for red spots extraction

Voici les résultats :

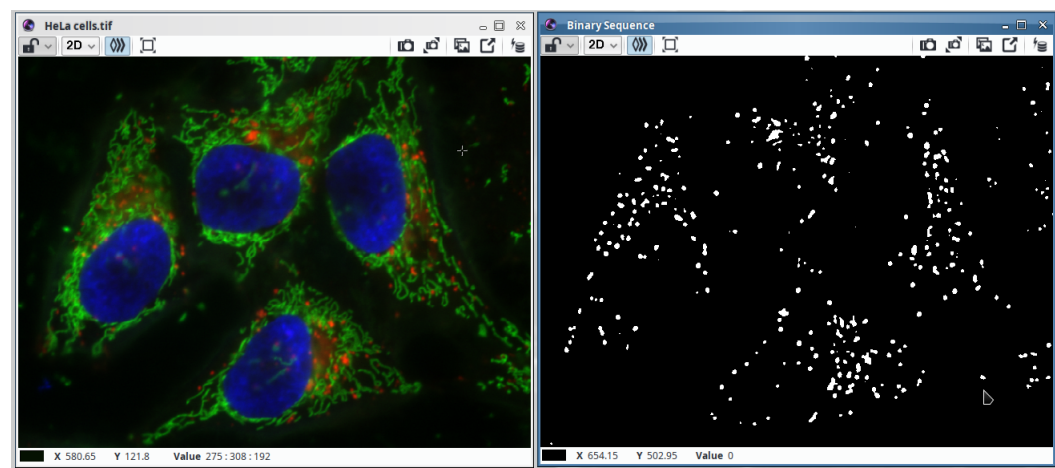


Figure 16: Result for red spots extraction