





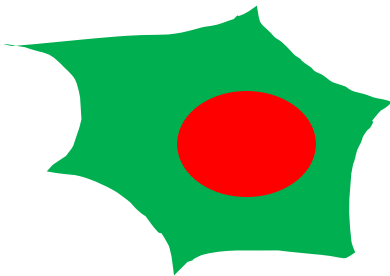
# Co-localisation

*Un mot, plusieurs sens*

## Co-localisation

### Co-expression

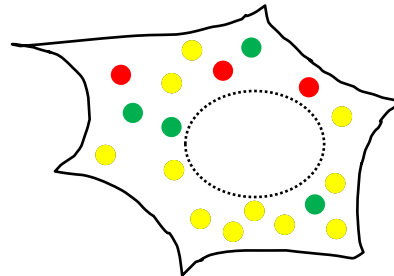
*Deux protéines  
dans un même  
contexte (cellule,  
structure  
anatomique etc)*



**OBJETS**

### Co-occurrence

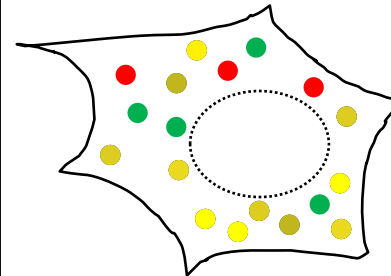
*A la résolution  
considérée, la  
localisation (d'une  
partie) des  
marquages ne peut  
être distinguée*



**OBJETS**

### Corrélation

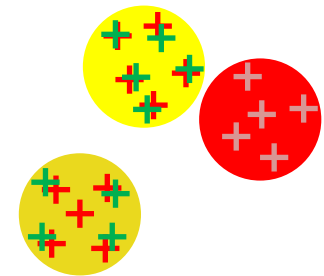
*A la résolution  
considérée, les  
intensités (d'une  
partie) des  
marquages sont  
liées*



**INTENSITES**

### Co-distribution

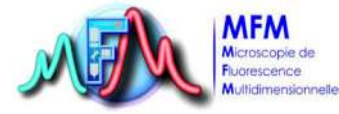
*A la résolution  
considérée, la  
distribution spatiale  
des marquages est  
liée*



**OBJETS**



# Analyse de co-localisation Vue d'ensemble



Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

Comparer et  
interpréter



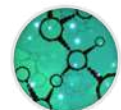
FRANCE-BIOIMAGING

Les petits séminaires confinés du RT-MFM





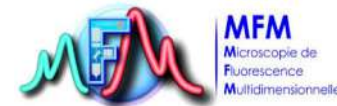
Vérifier l'intégrité des données





# Vérifier l'intégrité des données

## Excitation/détection croisées



Vérifier l'intégrité  
des données

### Marqueurs

*Vérifier l'absence  
d'excitation/détection croisées*

Sur le cytofluorogramme,  
vérifier l'absence de nuages de  
points à proximité des axes

### Co-alignement

*S'assurer que ce qui doit co-  
localiser co-localise*

Utiliser une lame de référence  
(billes multimarquées, lames  
commerciales etc) pour vérifier  
le co-alignement et caractériser  
les aberrations

Vous pouvez utiliser le greffon  
MetroloJ !

### Résolution

*Connaitre les limites du  
microscope*

Utiliser une lame de référence  
(billes multimarquées, lames  
commerciales etc) pour vérifier  
le co-alignement et caractériser  
les aberrations

Vous pouvez utiliser le greffon  
MetroloJ !





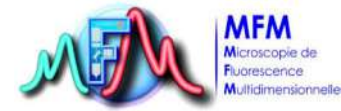
## Préparer les images





# Préparer les images

## Corrections



Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

### Corrections

#### *Liées à l'optique*

- Excitation/détection croisées: si possible, retourner au microscope ; à défaut tenter le démultiplexage
- Aberration chromatique: si possible la corriger directement sur le microscope avant de tenter une compensation par translation d'images

#### *Fond et bruit*

- Filtre médian: Ok mais détériore la résolution
- Débruitage: à ne pas utiliser en mode « boîte noire » !

### Restauration

#### *Déconvolution:*

- A ne pas utiliser en mode « boîte noire » !
- Bien choisir son algorithme (conservatif, nb itérations/critère d'arrêt)
- Bien connaître sa PSF
- S'assurer que la PSF est la « même » partout ou utiliser un algorithme en utilisant plusieurs
- Chercher et identifier les artefacts

#### *Apprentissage par ordinateur:*

- D'utilisation plutôt récente en microscopie
- Assurément un outil à explorer

### Segmentation

#### *Classifier les pixels: objets vs fond:*

- Simple seuillage ?
- Seuillage adaptatif ? Local ?
- Autre ?

#### *Isoler/détourer les objets*

- Analyse en composantes connexes: étiqueter les objets individuels
- Déterminer les contours ? (snake etc)
- Extraire els points d'intérêt (ex: centres)

#### *Si l'on travaille sur des détections:*

- Grouper les détections en objets ? (ex: tessellation)











# Choisir une métrique

## Indicateur vs quantificateur

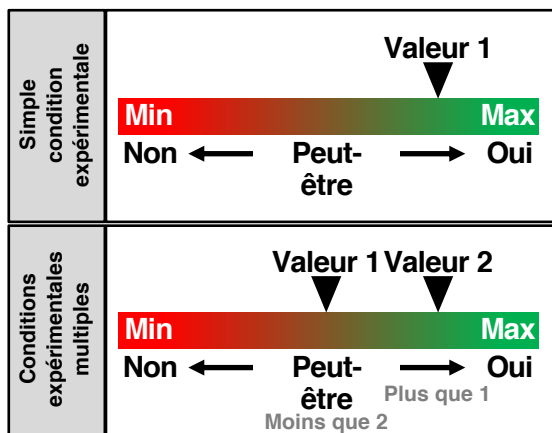
Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

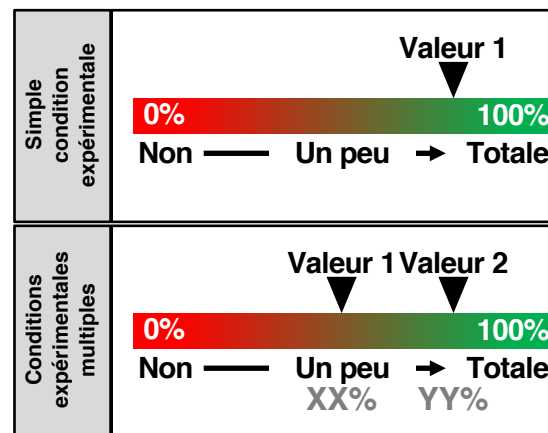
### Indicateur

« Valeur numérique évaluant le degré de coïncidence entre signaux au regard d'une échelle pré-définie. Ils peuvent être utilisés pour des comparaisons (relatifs) mais ne fournissent généralement pas de quantification directe pour de la quantité de recouvrement »

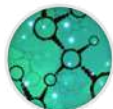


### Quantificateur

« Fournit à l'expérimentateur une valeur absolue, quantifiant le degré de coïncidence du signal, en utilisant les intensités, des descripteurs physiques (aire, volume etc) ou des distances entre coordonnées. »



Définitions issues de: F. P. Cordelières et S. Bolte, *Methods Cell Biol.*, vol. 123, pp. 395–408, Jan. 2014.





# Choisir une métrique

## Indicateur vs quantificateur

Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

### Coefficient de corrélation de Pearson

$$r_p = \frac{\sum_i (R_i - R_{aver}) \times (G_i - G_{aver})}{\sqrt{\sum_i (R_i - R_{aver})^2 \times \sum_i (G_i - G_{aver})^2}}$$

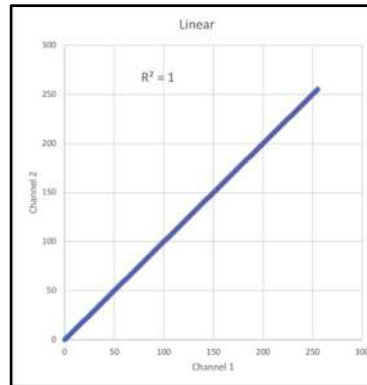


### Indicateur

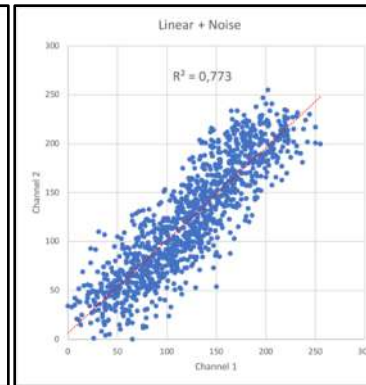
« Valeur numérique évaluant le degré de coïncidence entre signaux au regard d'une échelle pré-définie. Ils peuvent être utilisés pour des comparaisons (relatifs) mais ne fournissent généralement pas de quantification directe pour de la quantité de recouvrement »

Simple condition expérimentale	<p>Valeur 1</p> <p>Min Non ← Peut-être → Oui Max</p>
Conditions expérimentales multiples	<p>Valeur 1 Valeur 2</p> <p>Min Non ← Peut-être → Oui Max</p> <p>Moins que 1 Plus que 1</p>

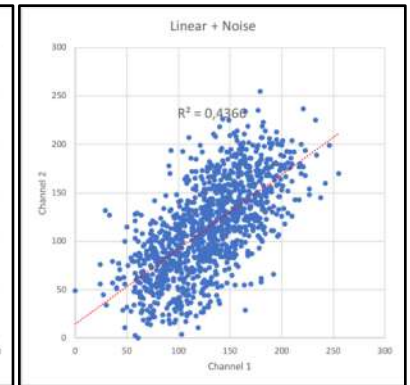
« Le carré du CCP (habituellement noté  $R^2$ ) est [...] une statistique estimant la fraction de variabilité de G qui s'explique par régression linéaire de R »



Sans bruit,  $R^2=1$

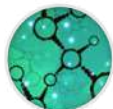


+ Bas bruit,  $R^2=0.77$



+ Bruit élevé,  $R^2=0.44$

Formules: E. M. Manders, et al., J. Cell Sci., vol. 103, pp. 857–62, Nov. 1992. / Lien avec  $R^2$ : K. W. Dunn, et al., AJP Cell Physiol., vol. 300, pp. C723–C742, 2011.





# Choisir une métrique

## Indicateur vs quantificateur

Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

De nombreux indicateurs existent !

### Indicateur

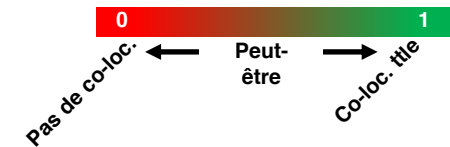
« Valeur numérique évaluant le degré de coïncidence entre signaux au regard d'une échelle pré-définie. Ils peuvent être utilisés pour des comparaisons (relatifs) mais ne fournissent généralement pas de quantification directe pour de la quantité de recouvrement »

Simple condition expérimentale	<p>Valeur 1</p> <p>Min Non ← Peut-être → Oui Max</p>
Conditions expérimentales multiples	<p>Valeur 1 Valeur 2</p> <p>Min Non ← Peut-être → Oui Max</p> <p>Plus que 1 Moins que 2</p>

### Overlap coefficient

$$r = \frac{\sum_i R_i \times G_i}{\sqrt{\sum_i (R_i)^2 \times \sum_i (G_i)^2}}$$

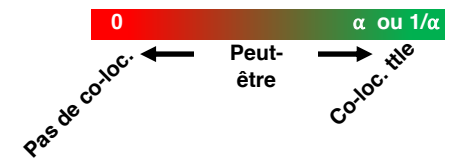
**Numérateur:** devient élevé lorsque  $R_i$  et  $G_i$  sont associés au même voxel (co-loc.)  
**Dénominateur:** proportionnel au nombre global de voxels non nuls



### Coefficients $k_1$ & $k_2$

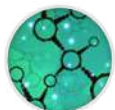
$$r^2 = k_1 \times k_2 \quad k_1 = \frac{\sum_i R_i \times G_i}{\sqrt{\sum_i R_i^2}} \quad k_2 = \frac{\sum_i R_i \times G_i}{\sqrt{\sum_i G_i^2}}$$

$k_1$ : sensible aux différences d'intensités du canal vert  
 $k_2$ : sensible aux différences d'intensités du canal rouge  
 Si  $R_i = \alpha G_i$ ,  $k_1 = 1/\alpha$  et  $k_2 = \alpha$



→ Fondations des coefficients de Manders

E. M. Manders, et al., J. Cell Sci., vol. 103, pp. 857–62, Nov. 1992.





# Choisir une métrique

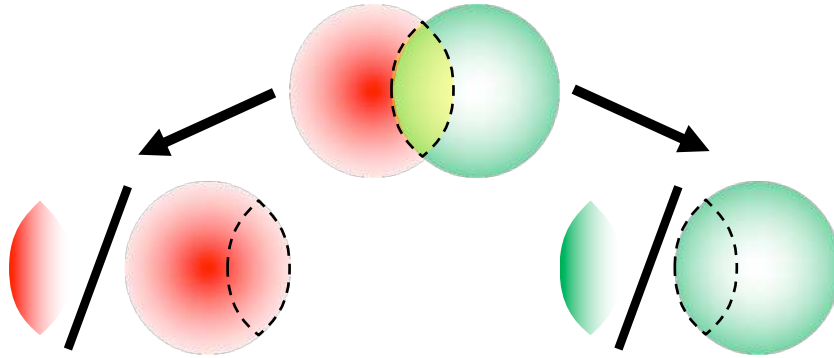
## Indicateur vs quantificateur

Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

### Basé sur un recouvrement des intensités



### Coefficients de Manders:

- 1-Choisir le seuil adapté pour chaque canal
- 2-Dans la zone de recouvrement, déterminer la somme des intensités supérieures au seuil, pour chaque canal
- 3-Faire de même sur l'image complète
- 4-Pour chaque canal, calculer le ratio 2/3

$$M_1 = \frac{\sum_i A_{i,coloc}}{\sum_i A_i}$$

Papier original: avec  $A_{i,coloc}=A_i$  si  $B_i>0$ , 0 sinon  
Modifié:  $tM_1$ , avec  $A_{i,coloc}=A_i$  si  $B_i>Thr_B$ , 0 sinon

$$M_2 = \frac{\sum_i B_{i,coloc}}{\sum_i B_i}$$

Papier original: avec  $B_{i,coloc}=B_i$  si  $A_i>0$ , 0 sinon  
Modifié:  $tM_2$ , avec  $B_{i,coloc}=B_i$  si  $A_i>Thr_A$ , 0 sinon

### Quantificateur

« Fournit à l'expérimentateur une valeur absolue, quantifiant le degré de coïncidence du signal, en utilisant les intensités, des descripteurs physiques (aire, volume etc) ou des distances entre coordonnées. »

Simple condition expérimentale	<p>Valeur 1</p> <p>0% — 100%</p> <p>Non — Un peu → Totale</p>
Conditions expérimentales multiples	<p>Valeur 1 Valeur 2</p> <p>0% — 100%</p> <p>Non — Un peu → Totale</p> <p>XX% YY%</p>

E. M. Manders, *et al.*, *J. Cell Sci.*, vol. 103, pp. 857–62, Nov. 1992.





# Choisir une métrique

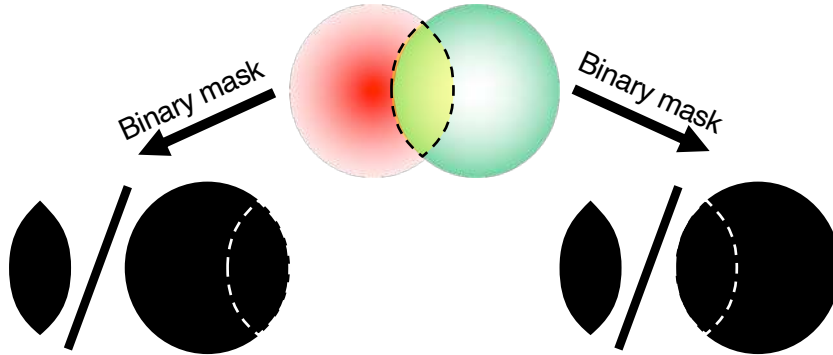
## Indicateur vs quantificateur

Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

### Basé sur un recouvrement des pixels



### Coefficients de Manders modifiés/coefficient d'intersection:

- 1-Choisir le seuil adapté pour chaque canal
- 2-Dans la zone de recouvrement, déterminer le nombre de pixels d'intensité supérieures au seuil, pour chaque canal
- 3-Faire de même sur l'image complète
- 4-Pour chaque canal, calculer le ratio 2/3

$$M_1 = \frac{\sum_i A_{i,coloc}}{\sum_i A_i}$$

Avec  $A_{i,coloc}=1$  si  $B_i > Thr_B$ , 0 sinon  
et  $A_i=1$  si  $A_i > Thr_A$ , 0 sinon

$$M_2 = \frac{\sum_i B_{i,coloc}}{\sum_i B_i}$$

Avec  $B_{i,coloc}=B_i$  si  $A_i > Thr_A$ , 0 sinon  
et  $B_i=1$  si  $B_i > Thr_B$ , 0 sinon

### Quantificateur

« Fournit à l'expérimentateur une valeur absolue, quantifiant le degré de coïncidence du signal, en utilisant les intensités, des descripteurs physiques (aire, volume etc) ou des distances entre coordonnées. »

Simple condition expérimentale	<p>Valeur 1</p> <p>0% 100%</p> <p>Non — Un peu → Totale</p>
Conditions expérimentales multiples	<p>Valeur 1 Valeur 2</p> <p>0% 100%</p> <p>Non — Un peu → Totale</p> <p>XX% YY%</p>

E. M. Manders, et al., J. Cell Sci., vol. 103, pp. 857–62, Nov. 1992.





# Choisir une métrique

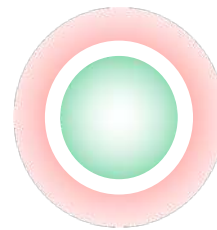
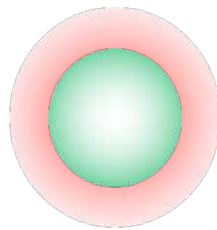
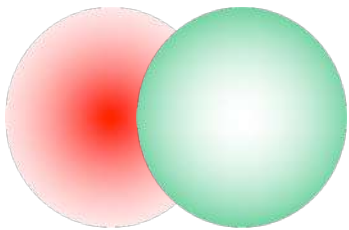
## Indicateur vs quantificateur

Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

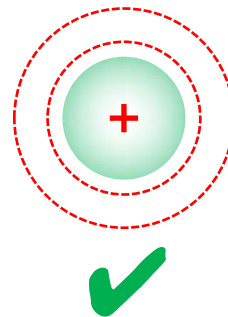
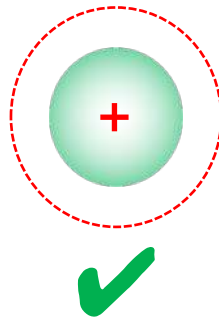
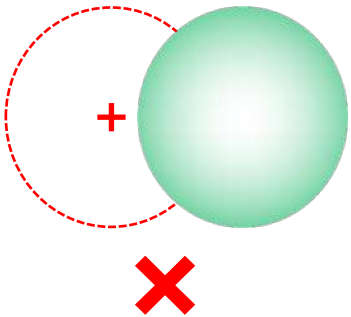
Choisir une métrique

### Basé sur la coïncidence centre/objet



#### Méthode:

- 1-Déterminer les centres (de masse ou géométriques) pour les objets du canal 1
- 2-Déterminer la proportion de centres des objets du canal 1 se superposant aux objets du canal 2
- 3-Répéter 1 & 2, en utilisant les objets du canal 1 et les centres du canal 2



### Quantificateur

« Fournit à l'expérimentateur une valeur absolue, quantifiant le degré de coïncidence du signal, en utilisant les intensités, des descripteurs physiques (aire, volume etc) ou des distances entre coordonnées. »

Simple condition expérimentale	Valeur 1 ▼ 0% ————— 100% Non — Un peu → Totale	
Conditions expérimentales multiples	Valeur 1 Valeur 2 ▼ ▼ 0% ————— 100% Non — Un peu → Totale XX% YY%	

E. Lachmanovich, et al., *J. Microsc.*, vol. 212, pp. 122–31, 2003.







# Choisir une métrique

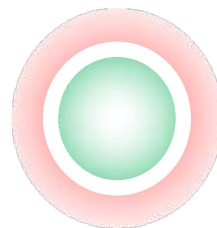
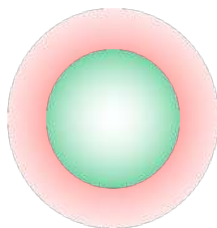
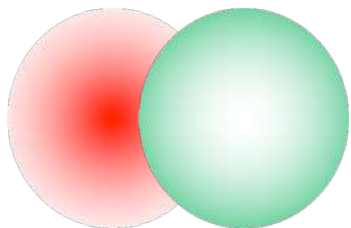
## Indicateur vs quantificateur

Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

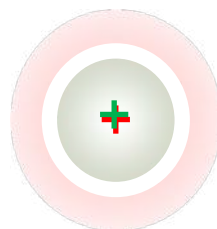
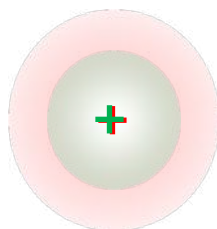
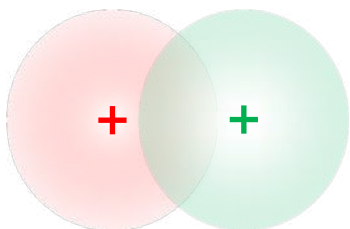
Choisir une métrique

### Basé sur les distances centre à centre



#### Méthode:

- 1-Déterminer les centres des objets des canaux 1 & 2
- 2-Calculer la distance entre chaque centre d'un canal et les centres du second canal
- 3-Définir une métrique, ex: proportion de centres situés à une distance inférieure à la résolution



### Quantificateur

« Fournit à l'expérimentateur une valeur absolue, quantifiant le degré de coïncidence du signal, en utilisant les intensités, des descripteurs physiques (aire, volume etc) ou des distances entre coordonnées. »

Simple condition expérimentale	<p>Valeur 1</p> <p>0% 100%</p> <p>Non — Un peu → Totale</p>
	<p>Valeur 1 Valeur 2</p> <p>0% 100%</p> <p>Non — Un peu → Totale</p> <p>XX% YY%</p>

F.P. Cordelières et S. Bolte, JACoP v2.0: improving the user experience with co-localization studies, in *ImageJ User&Developer Conference*, 2008, 174–181.









# Co-localisation workflows

## *Comparer et interpréter*

Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

Comparer et  
interpréter

### Stratégie 1: Rotation

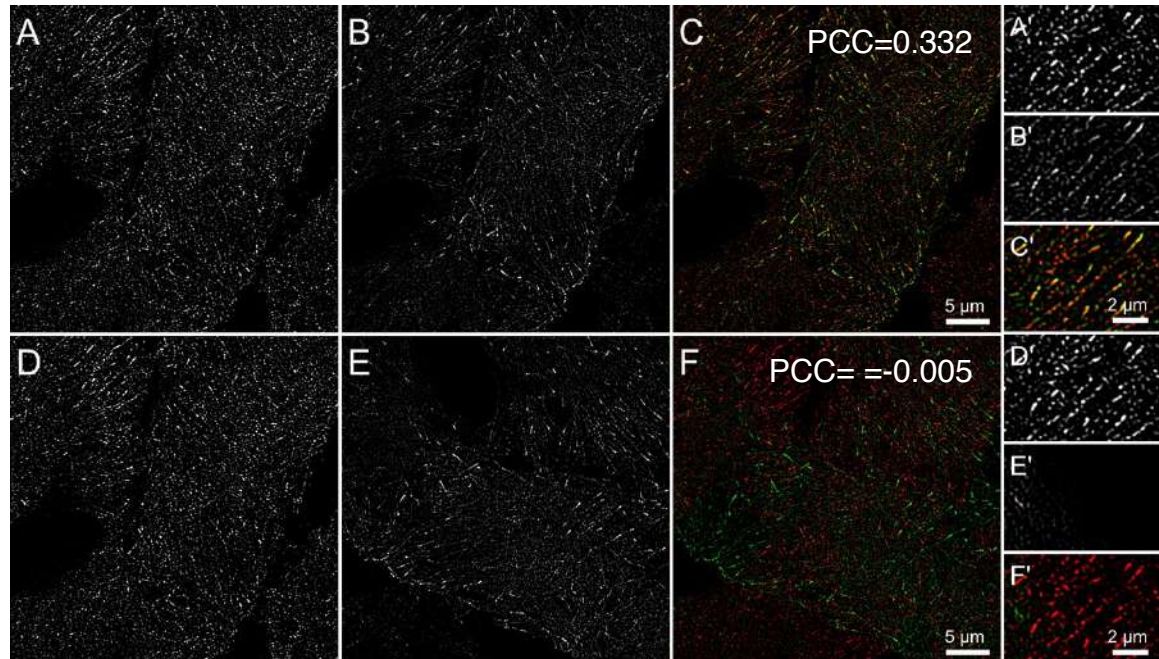
#### Cas de la condition expérimentale unique: Interpréter les données

##### Méthode:

- Générer un jeu de données au contenu identique, mais localise différemment
- Comparer au jeu de données original

##### En pratique:

- Si la hauteur et la largeur d'image sont identiques, pivoter l'une des 2 images de 90



**A lire:** J.H. McDonald and K.W. Dunn, Statistical tests for measures of colocalization in biological microscopy., *J. Microsc.*, 252:295–302, 2013.





# Co-localisation workflows

## Comparer et interpréter

Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

Comparer et  
interpréter

### Stratégie 2: Translater

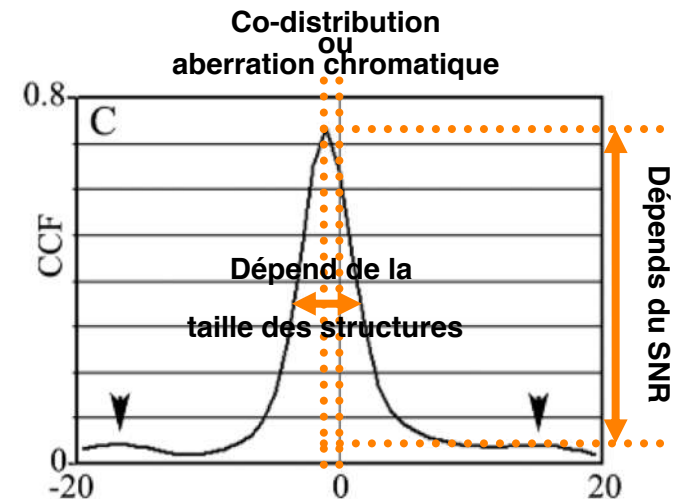
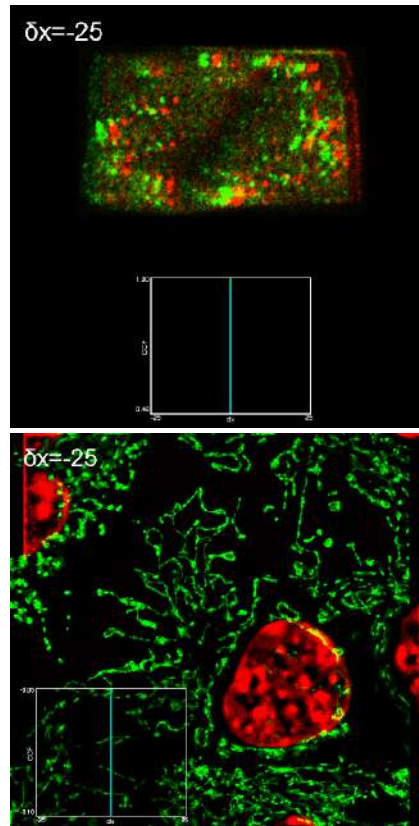
#### Cas de la condition expérimentale unique: Interpréter les données

##### Méthode:

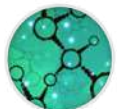
- Générer un jeu de données au contenu identique, mais localise différemment
- Comparer au jeu de données original

##### En pratique:

- Si la hauteur et la largeur d'image sont identiques, pivoter l'une des 2 images de 90
- Translater une image par rapport à l'autre



B. van Steensel, et al., *J. Cell Sci.*, vol. 792, pp. 787–792, 1996.





# Co-localisation workflows

## Comparer et interpréter

Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

Comparer et  
interpréter

### Stratégie 3: Randomisation

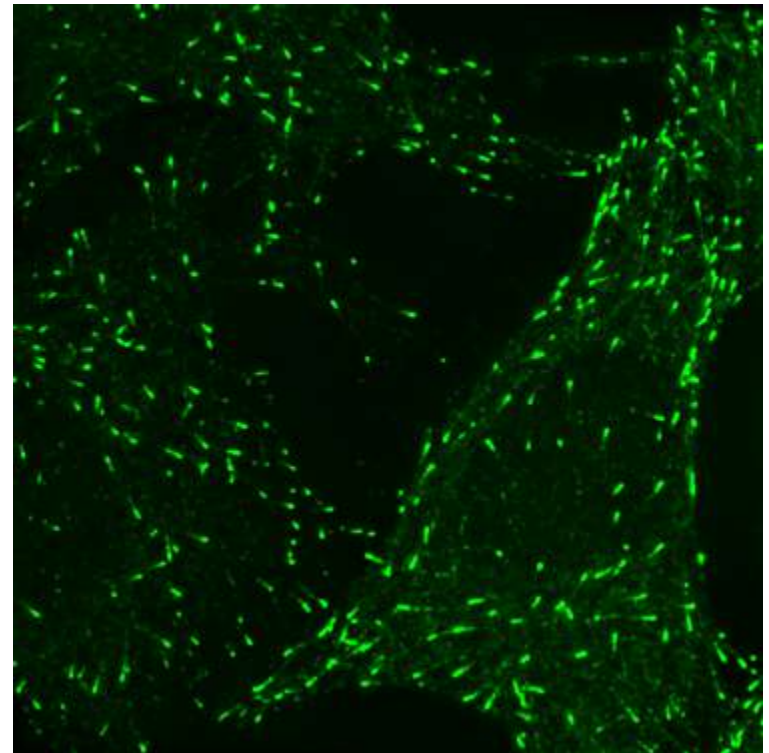
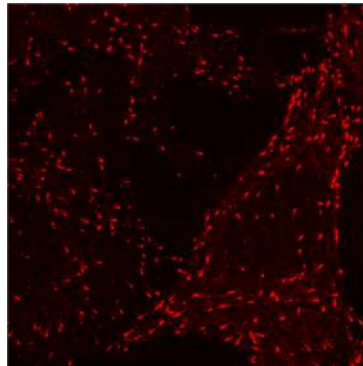
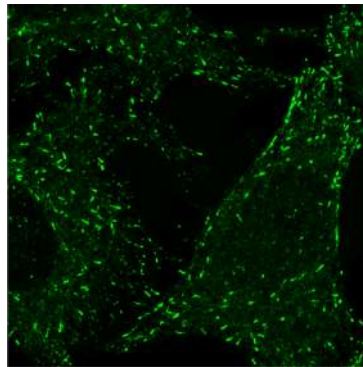
#### Cas de la condition expérimentale unique: Interpréter les données

##### Méthode:

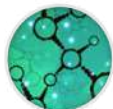
- Générer un jeu de données au contenu identique, mais localise différemment
- Comparer au jeu de données original

##### En pratique:

- Si la hauteur et la largeur d'image sont identiques, pivoter l'une des 2 images de 90
- Translater une image par rapport à l'autre
- Randomiser l'image



S. V Costes, D. Daelemans, E. H. Cho, Z. Dobbin, G. Pavlakis, and S. Lockett, *Biophys. J.*, vol. 86, no. 6, pp. 3993–4003, Jun. 2004.







# Co-localisation workflows

## Comparer et interpréter

Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

Comparer et  
interpréter

### Stratégie 3: Randomisation

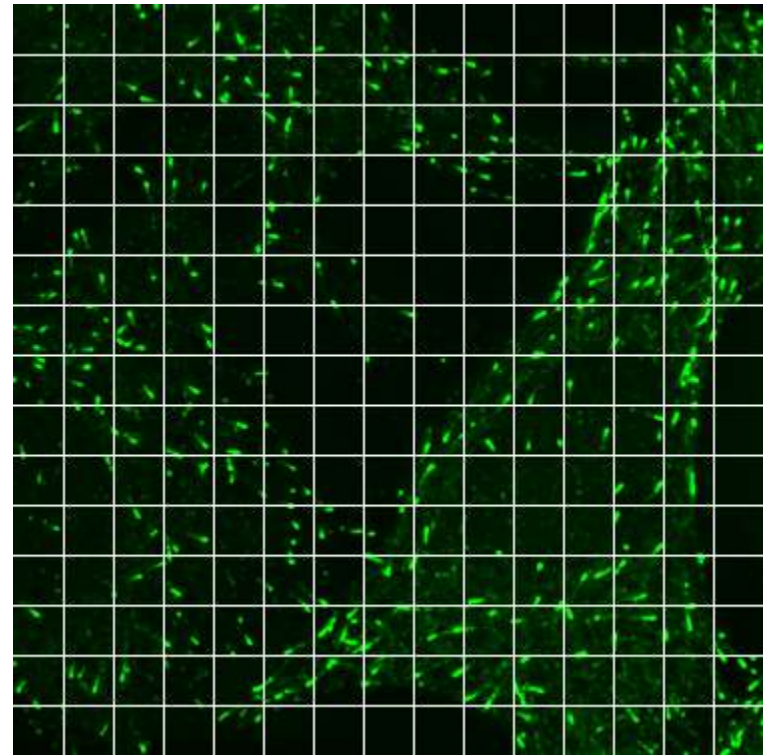
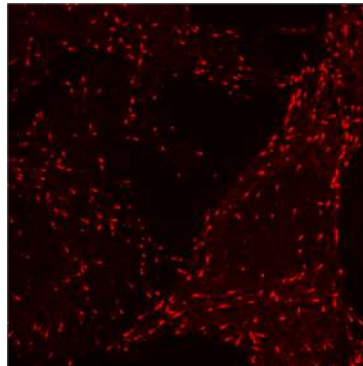
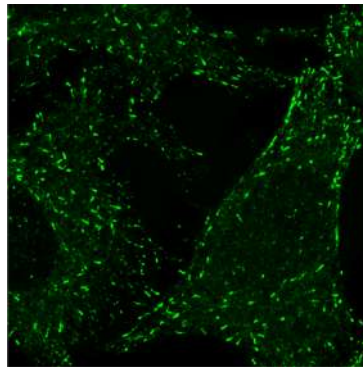
#### Cas de la condition expérimentale unique: Interpréter les données

##### Méthode:

- Générer un jeu de données au contenu identique, mais localise différemment
- Comparer au jeu de données original

##### En pratique:

- Si la hauteur et la largeur d'image sont identiques, pivoter l'une des 2 images de 90
- Translater une image par rapport à l'autre
- Randomiser l'image



S. V Costes, D. Daelemans, E. H. Cho, Z. Dobbin, G. Pavlakis, and S. Lockett, *Biophys. J.*, vol. 86, no. 6, pp. 3993–4003, Jun. 2004.





# Co-localisation workflows

## Comparer et interpréter

Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

Comparer et  
interpréter

### Stratégie 3: Randomisation

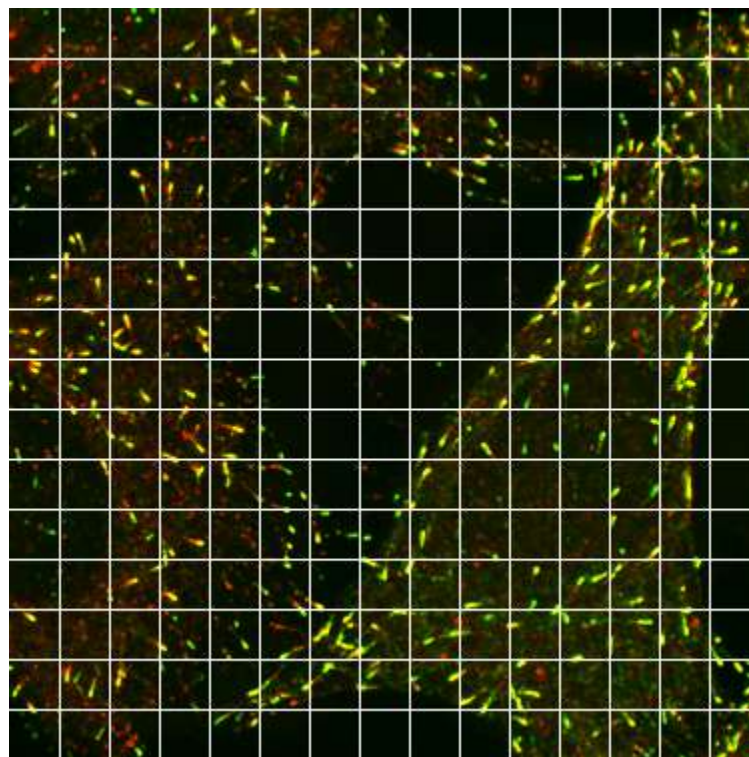
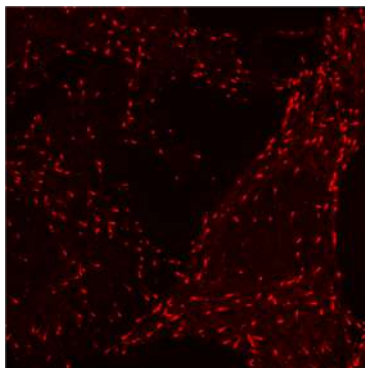
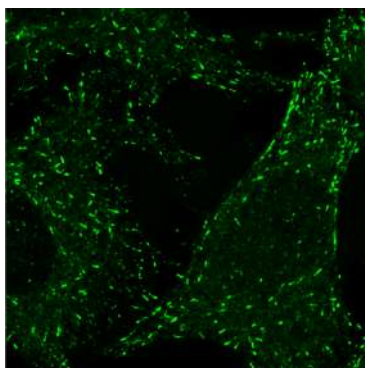
#### Cas de la condition expérimentale unique: Interpréter les données

##### Méthode:

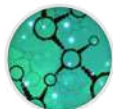
- Générer un jeu de données au contenu identique, mais localise différemment
- Comparer au jeu de données original

##### En pratique:

- Si la hauteur et la largeur d'image sont identiques, pivoter l'une des 2 images de 90
- Translater une image par rapport à l'autre
- Randomiser l'image



S. V Costes, D. Daelemans, E. H. Cho, Z. Dobbin, G. Pavlakis, and S. Lockett, *Biophys. J.*, vol. 86, no. 6, pp. 3993–4003, Jun. 2004.





# Co-localisation workflows

## Comparer et interpréter

Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

Comparer et  
interpréter

### Stratégie 3: Randomisation

#### Cas de la condition expérimentale unique: Interpréter les données

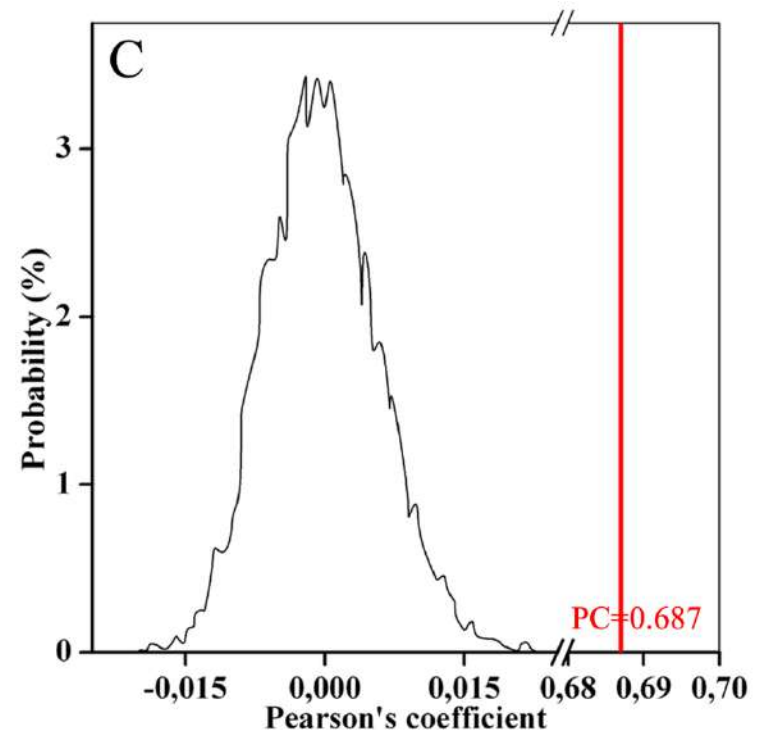
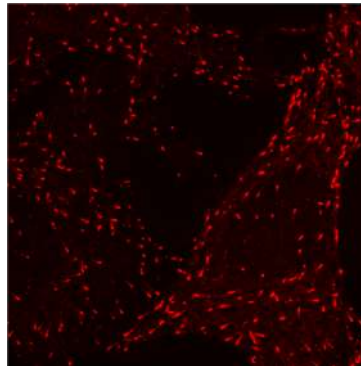
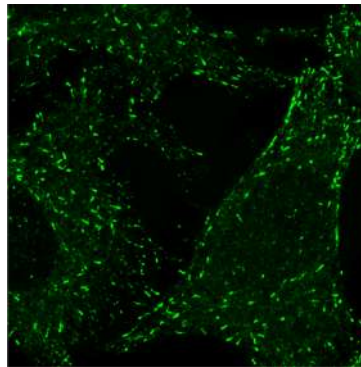
##### Méthode:

- Générer un jeu de données au contenu identique, mais localise différemment
- Comparer au jeu de données original

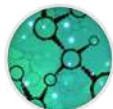
##### En pratique:

- Si la hauteur et la largeur d'image sont identiques, pivoter l'une des 2 images de 90
- Translater une image par rapport à l'autre
- Randomiser l'image

**Attention au problème de corrélation locale due à la PSF !**



S. V Costes, D. Daelemans, E. H. Cho, Z. Dobbin, G. Pavlakis, and S. Lockett, *Biophys. J.*, vol. 86, no. 6, pp. 3993–4003, Jun. 2004.







# Co-localisation workflows

## *Comparer et interpréter*

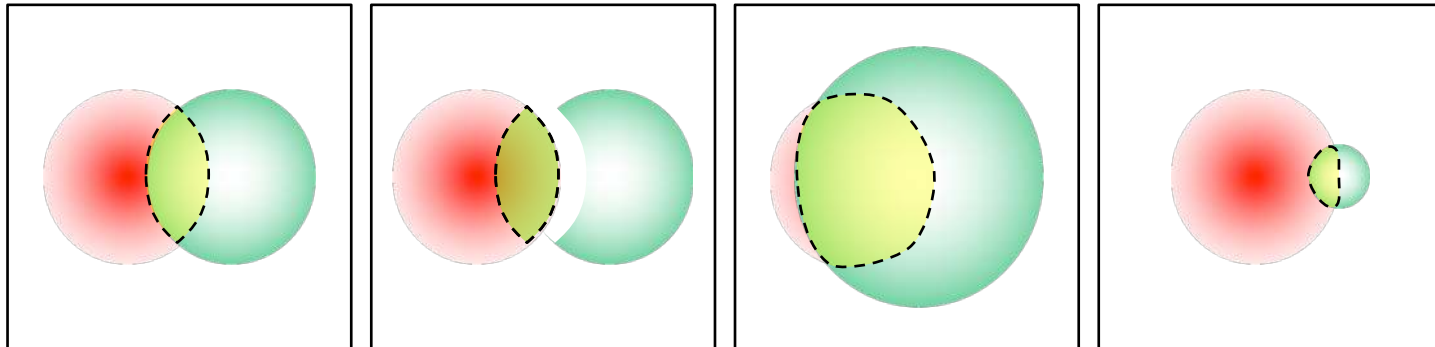
Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

Comparer et  
interpréter

**Attention ! Une même valeur ne signifie pas toujours la même chose !!!**



**A lire:** J.H. McDonald and K.W. Dunn, Statistical tests for measures of colocalization in biological microscopy., *J. Microsc.*, 252:295–302, 2013.





# Co-localisation workflows

## Quel logiciel utiliser ?

Vérifier l'intégrité  
des données

Préparer les images

Choisir une métrique

Comparer et  
interpréter

### Les questions à se poser:

- Quel type de co-localisation est le plus approprié pour votre problématique ?
- Les méthodes publiées sont-elles adaptées à votre problématique ?

### En fonction des réponses:

- Non: soyez inventifs: bâtissez votre métrique !
- Oui: à vous de choisir !



## Chapter 10

### Which Elements to Build Co-localization Workflows? From Metrology to Analysis

Patrice Mascalchi and Fabrice P. Cordelières

#### Abstract

Co-localization analysis is one of the main interests of users entering a facility with slides in hands and nice analysis perspectives in mind. While being available through most, if not all, analysis software, co-localization tools are mainly perceived as black boxes, fed with images, that will, hopefully, return (the expected) numbers.

In this chapter, we will aim at deconstructing existing generic co-localization workflows, extracting elementary tools that may be reused and recombined to generate new workflows. By differentiating work cases, identifying co-localization reporters and the metrics others have been using, we aim at providing the audience with the elementary bricks and methods to build their really own co-localization workflows. A special emphasis is given on the preparatory phase where the acquisition system is assessed, using basic metrological tests.

**Key words** Co-localization, Co-expression, Co-occurrence, Correlation, Co-distribution, Elements, Workflow, Image processing, Image analysis

#### 1 Introduction

##### 1.1 Co-localization or Co-localizations: One Word, Many Meanings

From the biologist perspective, co-localization often appears as a word conveying several meanings. Its precise definition is highly linked to the phenomenon the experimenter is trying to characterize (Fig. 1).

When dealing with large-scale samples, such as slices of tissues, the word "co-localization" is generally used in the sense "co-expression." In this case, the aim is to determine whether a same set of cells are positive for two proteins of interest. This experimental situation does not presuppose the two molecular actors to be at the same location. One could expect "co-localization" while, for example, working on a nuclear transcription factor and the product

**Electronic supplementary material:** The online version of this chapter ([https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9686-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9686-5_10)) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Elvira Rebollo and Marcel Bosch (eds.), *Computer Optimized Microscopy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 2040, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9686-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9686-5_10), © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

177

Mascalchi P., Cordelières F.P. (2019) In: Rebollo E., Bosch M. (eds) *Computer Optimized Microscopy. Methods in Molecular Biology*, vol 2040.

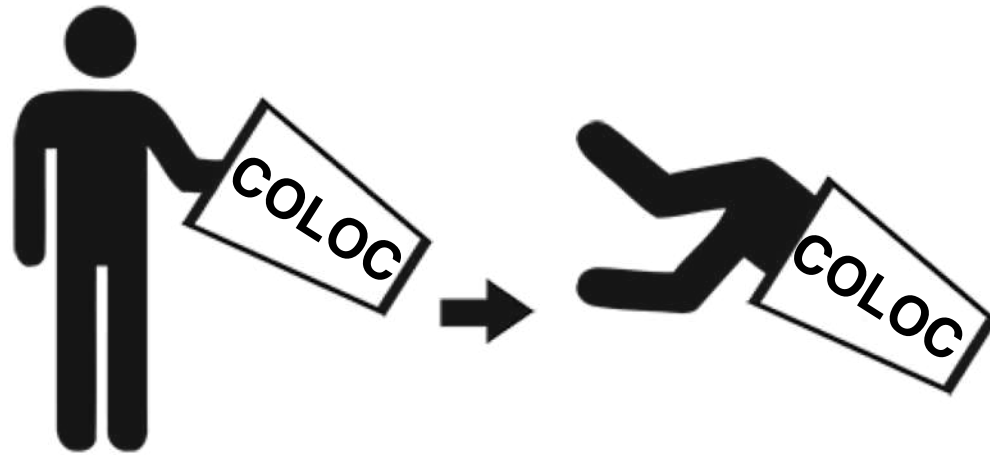




Un dernier conseil ?

*Réfléchissez, soyez créatifs, testez faites-vous aider... répétez*

# DANGER



# THIS MACHINE HATES IDIOTS

