

Classification de types de neurones à partir de signaux calciques

Guillaume BECQ¹, Nagham BADREDDINE², Nicolas TREMBLAY¹, Florence APPAIX², Gisela ZALCMAN², Elodie FINO²,
Sophie ACHARD¹

¹Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Gipsa-lab, F-38000, Grenoble, France

²Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, Grenoble Institut Neurosciences, GIN, F-38000 Grenoble, France
guillaume.becq@gipsa-lab.fr

Résumé – Les activités calciques de neurones dans des tranches de striatum de souris sont enregistrées en réponse à des stimulations sous forme de films par microscopie de fluorescence biphoton. Les neurones sont repérés sur les images sous forme de régions d'intérêt (ROI) et étiquetés suivant deux classes: neurone épineux moyen (medium spiny neuron, MSN) ; interneurone (interneuron, IN). L'analyse des ROI permet de calculer les signaux calciques neuronaux. Des caractéristiques sont extraites sur ces ROI et sur ces signaux calciques. Une recherche des caractéristiques pertinentes est proposée en utilisant une analyse discriminante quadratique sur la base d'un apprentissage supervisé des deux classes de neurones du striatum. On montre qu'une évaluation réaliste de la base de données permet d'obtenir un taux de bonne classification de l'ordre de 75 % pour les IN, tout en obtenant un taux de bonne classification de l'ordre de 90 % pour les MSN.

Abstract – Videos of calcium activities of mice striatum slices are recorded under stimulations by two-photon fluorescence microscopy. Neurons are selected by regions of interests (ROI) on the images and labelled into two classes: medium spiny neuron (MSN); interneurons (IN). Each ROI enables to obtain a neural signal. Features are extracted on these ROI and signals. A subset feature selection is performed with a quadratic discriminant analysis, to solve the supervised learning of the two classes of neuron of the striatum. It is shown, that a realistic evaluation of the database leads to a classification with an accuracy of 75 % for IN and 90% for MSN.

1 Introduction

L'imagerie calcique est devenue une technique de référence pour l'étude de la dynamique des réseaux neuronaux [1]. Elle permet d'obtenir une résolution spatiale qui permet d'enregistrer l'activité synchrone d'une population de neurones, tout en proposant une résolution temporelle qui permet d'évaluer la réponse neuronale de chaque cellule. Elle reste toutefois limitée par des dynamiques basses fréquences, des réponses qui ne peuvent être calibrées et une sensibilité au bruit importante. Pour rendre les mesures comparables, le rapport de la fluorescence relative sur la fluorescence de la ligne de base, généralement noté $\Delta F/F$, permet de mettre en évidence la diversité des réponses des différents types de neurones [1]. Dans notre étude nous nous intéressons au striatum de la souris, une région impliquée dans l'apprentissage procédurale [2, 3]. Celle-ci fait partie de la boucle thalamo-corticale, impliquée dans la prise de décision des mouvements à réaliser face à une tâche donnée. Elle contient des neurones inhibiteurs, de différents types, dont 95 % sont des neurones épineux moyens (medium spiny neuron, MSN) et 5 % des interneurons (IN) [4]. Les souris sont sacrifiées, leur cerveau est prélevé et des tranches dans les structures d'intérêt sont prélevées. Une stimulation électrique est réalisée dans une partie corticale de la tranche qui vient stimuler naturellement la zone du striatum enregistrée. Dans cette étude, nous étudions la classification des différents types de neurones MSN et IN à partir de caractéristiques ex-

traitées à partir des formes des neurones repérés sur les images et de leurs dynamiques calciques induites par stimulations électriques. Nous étudions les limites d'un apprentissage supervisé en nous focalisant sur une classification par analyse discriminante quadratique, simple à mettre en place, qui semble convenir aux frontières de décision de notre problème et qui présente l'avantage d'apporter des solutions stables sans avoir à régler trop d'hyperparamètres [5, 6]. Dans un premier temps nous décrivons la chaîne de traitement des données permettant de générer la base de données des caractéristiques. Ensuite nous décrivons les résultats obtenus par différentes techniques d'apprentissage supervisé. Enfin nous discutons des résultats présentés et des améliorations possibles.

2 Résultats

2.1 Traitement des images et description des caractéristiques

Une séquence de 81 images dans un champ carré de $392.66 \mu\text{m}$ de côté contenant 1024×1024 pixels est présentée Fig. 1a. Le temps entre chaque image est fixé sur cette représentation à 250 ms. Le film original est échantillonné à 15.3 Hz et contient 1000 images. La séquence d'images est explorée dans un premier temps sous ImageJ [7] ou Python en utilisant la bibliothèque scikit-image [8]. L'image moyenne estimée sur tous les

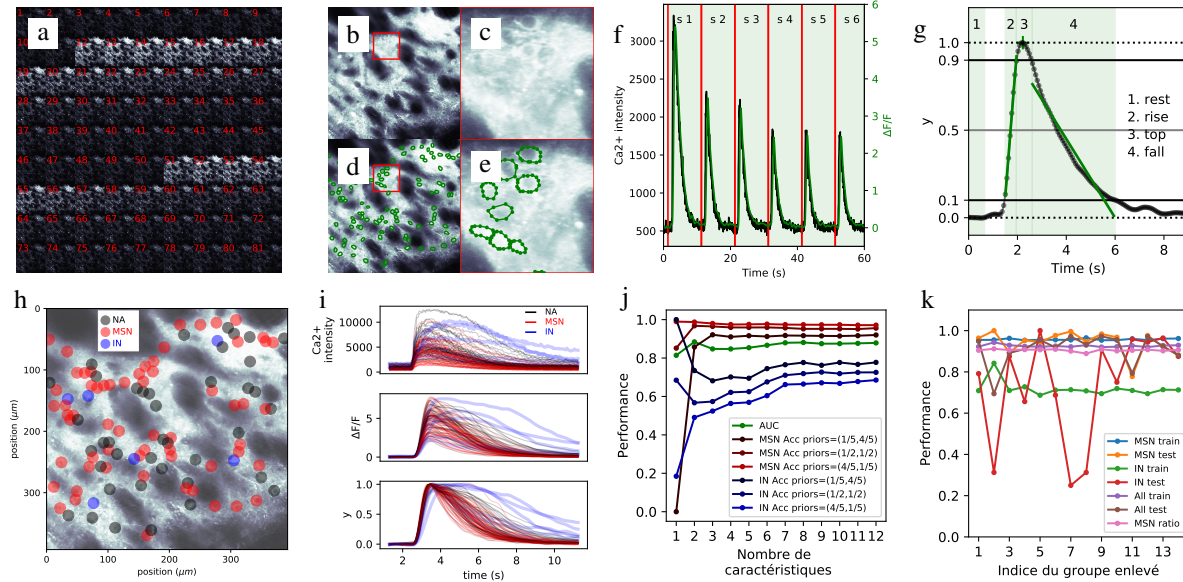


FIGURE 1 – Traitement des images, calcul des caractéristiques et résultats de classification. a) Extraits de la séquence d’images. b-e) image moyenne et sélection des neurones. f) Signal d’activité pour un neurone en réponse aux stimulations. g) Calcul des caractéristiques. h) Etiquetage des neurones. i) Réponses des neurones et normalisation. j) Performance des caractéristiques individuelles suivant le critère AUC. k) Performance suivant le taux de bonne classification, global ou par classe, en utilisant la méthode de validation leave-1-group-out. Un groupe correspond à une tranche disponible dans la base de données.

échantillons est présentée Fig. 1b, c. Celle-ci met en évidence les structures biologiques participant à l’activité calcique au sein de la tranche, en particulier les neurones, qui sont détectés visuellement. Des régions d’intérêts (regions of interests, ROI) de formes polygonales sont tracées sur l’image pour sélectionner les neurones (Fig. 1d, e). Des mesures dynamiques et statiques sont extraites à partir de ces ROI : 5 séries temporelles (MEAN, STDDEV, MODE, SKEW, KURT) et 11 paramètres statiques liés à la forme des ROI (AR, AREA, CIRC, FERET, FERET ANGLE, FERET MIN, FERET X, FERET Y, PERIM, ROUND, SOLIDITY)¹. Les échantillons des séries temporelles sont obtenus à partir des statistiques obtenues sur la distribution des intensités des pixels contenus dans un ROI. Dans la suite, on parlera du signal d’un neurone en considérant la série temporelle obtenue à partir de la statistique MEAN. Ce signal est représenté Fig.1.f. pour un neurone. L’intensité de Ca^{2+} correspond à l’intensité de la fluorescence de l’ion calcium. On remarque une variation de cette intensité en réponse aux stimulations repérées par des lignes verticales rouges. Afin de normaliser les données, les signaux de chaque neurone sont transformés par rapport à la ligne de base de la fluorescence F_0 , et un nouveau signal, généralement notée $\Delta F/F$, est calculée [9] : $\Delta F/F = (F - F_0)/F_0$ avec $F_0 = \frac{1}{n_0} \sum_{i=1}^{n_0} F(i)$. Dans notre étude, n_0 est fixé à 10 échantillons. Un filtre passe-bas (< 1 Hz) est ensuite utilisé pour éliminer les bruits hautes fréquences (Butterworth filter : - 3 dB à 1 Hz, - 40 dB à 4 Hz, ordre 3) et conduit au signal noté x par

la suite, présenté Fig1.f en vert. Les débuts et fins des stimulations sont marqués de façon à étudier chaque stimulation et en extraire des caractéristiques. Un zoom au cours d’une stimulation est proposé Fig.1.g. La période de stimulation est définie en retenant au moins 10 points avant la période de montée (rise) due à la stimulation pour permettre de calculer les valeurs au repos (rest) avant stimulation. Pour chaque stimulation, plusieurs opérations sont réalisées pour déterminer les périodes représentées sur la Fig.1.g, qui sont utilisées pour extraire certaines caractéristiques : • Calcul des valeurs d’écart-type sur le signal x et sur le signal brut, STD et STD RAW • Recherche de la valeur maximale X_{MAX} , au cours de la stimulation (pic) et intensité brute associée $X_{MAX RAW}$ • Recherche de la valeur moyenne de base sur la période de repos (rest), X_0 , définie sur 10 points : $x_0 = 1/10 \sum_{i=1}^{10} x(i)$ • Normalisation des données : $y = (x - x_0)/(x_{max} - x_0)$. Un exemple du résultat d’une telle transformation est donné Fig. 1.h. • Recherche des points caractéristiques pour la montée (rise), définie par le premier point < 0.9 à gauche en partant du pic, puis premier point < 0.1 • Idem pour la descente (fall) : premier point < 0.9 à droite en partant du pic, puis premier point < 0.1 • Régression sur les valeurs durant la montée, sur un modèle linéaire, $y = ax + b$, pour obtenir la pente, RISE LIN et régression sur un modèle logarithmique, $\log(y) = ax + b$, avec les valeurs négatives fixées à une valeur basse ($1e-5$), pour obtenir la pente RISE LOG • Calculs identiques sur les valeurs durant la descente FALL LIN, FALL LOG • Calcul du temps passé au dessus de 0.9 (top), T9 • Calcul du temps passé au dessus de 0.1 (rise + top + fall) • Calcul du temps passé au dessus de 0.5, T5 et durée du passage de top à 0.5 lors de la chute, T5P • Calcul des valeurs moyennes des signaux de X

1. (cf. <https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html#set> pour les définitions de ces mesures)

KURT, X SKEW, X STDDEV et X MODE. Finalement, 29 caractéristiques sont obtenues, 12 provenant des formes statiques et 17 provenant des séries temporelles.

Pour pouvoir réaliser un apprentissage supervisé, les neurones sont classées en 3 groupes, indéterminés (not available, NA), MSN et IN, selon expertise de l’anatomie des cellules, des marquages chimiques et une analyse visuelle des réponses. Un exemple de l’organisation spatiale d’une telle classification par un expert est proposé Fig. 1h. La comparaison des réponses à une stimulation pour les cellules de la tranche d’exemple est proposée Fig. 1i. On remarque que les cellules étiquetées IN ont des dynamiques différentes des MSN.

2.2 Définition de la base de données et classification par apprentissage supervisé

Dans cette étude, 14 tranches de cerveaux sont utilisées pour générer des échantillons étiquetés MSN et IN provenant de 14 groupes différents. Les proportions de neurones MSN et IN, et n le nombre total de neurones dans chaque groupe, résumés dans un triplet (pMSN, pIN, n), sont les suivantes : (0.91, 0.09, 68), (0.56, 0.44, 18), (0.89, 0.11, 37), (0.86, 0.14, 56), (0.82, 0.18, 22), (0.80, 0.20, 40), (0.97, 0.03, 63), (0.98, 0.02, 178), (0.85, 0.15, 72), (0.95, 0.05, 74), (0.91, 0.09, 69), (0.87, 0.13, 71), (0.93, 0.07, 103), (0.89, 0.11, 90). Pour chaque groupe, 4 stimulations (s2 – s5), cf Fig. 1f, sont retenues pour extraire les caractéristiques, la première étant particulière, et les autres étant présentes sur tous les enregistrements. Au final la base de données contient 3844 échantillons collectés représentant 3480 MSN et 364 IN. Plusieurs classifications supervisées sont évaluées à partir de cette base de données. Les traitements sont réalisés en Python en utilisant au maximum les fonctions disponibles dans scikit-learn [10].

Dans un premier temps, les performances de classification obtenues sur les caractéristiques, testés une par une, sont évaluées sur l’ensemble de la base de données. Pour évaluer les performances, une pondération est utilisée en fonction du nombre d’échantillon par groupe. Un calcul de l’aire sous la courbe (AUC)² à partir de l’estimation des courbes de sensibilité en fonction de la spécificité (courbe receiver operating characteristic ROC) [5, 6], conduit au classement suivant (AUC entre parenthèse) : FALL LOG (0.814), FALL LIN (0.807), T1 (0.791), X 0 (0.781), T5P (0.730), T5 (0.728), X SKEW (0.640), X 0 RAW (0.639), RISE LIN (0.636), T9 (0.632), RISE LOG (0.602), X STDDEV (0.595), FERET (0.583), ROUND (0.583), X KURT (0.581), CIRC (0.576), X MODE (0.575), AR (0.575), FERET ANGLE (0.569), XMAX RAW (0.569), FERET Y (0.564), PERIM (0.562), STD RAW (0.556), STD (0.553), FERET MIN (0.549), XMAX (0.548), FERET X (0.547), SOLIDITY (0.537), AREA (0.522).

Un tracé du graphe des corrélations entre caractéristiques i et j en prenant $|C_{ij}| > 0.7$ est proposé Fig. 2. Certaines caractéristiques semblent redondantes et peuvent être regroupées par groupe : (T9, T5P, T5, T1, FALL LOG*, FALL LIN), (X 0*), (X STDDEV, X 0 RAW*, X MODE), (RISE LIN*, RISE LOG), (X SKEW*, X KURT), (PERIM, FERET MIN, FERET*, AREA), (XMAX, STD*), (XMAX RAW*, STD RAW), (ROUND*, CIRC, AR), (SOLIDITY*), (FERET X*), (FERET

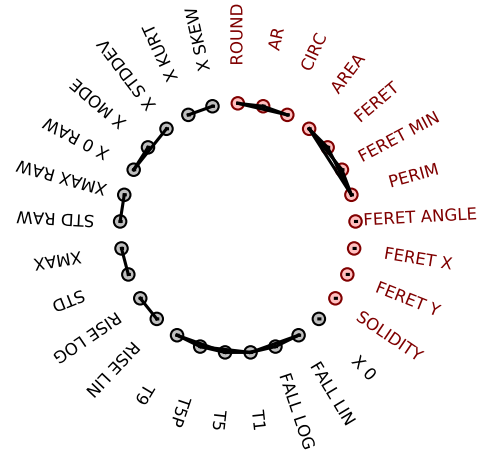


FIGURE 2 – Graphe de corrélation des caractéristiques. Les couleurs indiquent si les caractéristiques sont liées : à la forme des neurones en rouge, aux réponses lors des stimulations en noir.

ANGLE*). En ne retenant dans chaque groupe que la caractéristique, notée *, ayant la plus haute AUC, on réduit l’ensemble de caractéristiques à : FALL LOG, X 0, X 0 RAW, RISE LIN, X SKEW, FERET, STD, ... Un classifieur quadratique est testé en groupant de plus en plus de caractéristiques suivant une sélection séquentielle en avant (sequential forward selection SFS)[5] : (FALL LOG), (FALL LOG, X 0), (FALL LOG, X 0, X 0 RAW), ... Les performances de classification sont proposées Fig 1j en fonction du nombre de caractéristiques et des a priori de classes. On remarque qu’en retenant 3 caractéristiques, les performances se stabilisent quelque soit l’a priori sur les classes. Après 7 caractéristiques, les performances varient peu. Cet ensemble de 7 éléments est retenu pour la suite. Comme la base de données contient 14 groupes différents, des validations croisées en enlevant 1 groupe, puis 2 et 7, sont évaluées pour estimer les performances. La Fig. 1k présente les résultats en enlevant 1 groupe. On remarque que la classification des IN pose des problèmes pour 3 groupes. Une comparaison des matrices de confusion est proposée Tab. 1b en moyennant les proportions de classification par groupe et par classe. Le classifieur tend vers une probabilité d’erreur en test d’environ 27 % pour la classification des IN et 8 % pour celle des MSN. Les variations (standard error of the mean, SEM) des moyennes diminuent avec le nombre de groupes testés, indiquent une faible dispersion des performances. Les valeurs obtenues en apprentissage (train) et en test sont quasiment identiques et peuvent être considéré comme valeurs de généralisation.

3 Discussion

Nous avons des valeurs provenant de différents groupes, avec des distributions dans chaque classe qui ne sont pas les mêmes

2. problèmes à 2 classes IN versus MSN

TABLE 1 – Performances par Leave k Group Out (k-GO). (a) Notations pour les matrices de confusion. (b) Les valeurs moyennes des coefficients des matrices de confusion sont reportées en moyennant par rapport à tous les échantillons pondérés (global) ou en moyennant par classe (par classe). Les écart-types standardisés (standard error of the mean) sont indiqués par des symboles pour des valeurs supérieures à 0.01 avec les notations suivantes : $0.01 < + < 0.05 < ++ < 0.1$.

		1-GO		2-GO		7-GO				
a)		train	global	0.83	0.04	0.83	0.04	0.83	0.04	
				0.04	0.09	0.04	0.09	0.03	0.10	
			train	per	0.96	0.04	0.96	0.04	0.96	0.04
				class	0.28+	0.72+	0.28+	0.72+	0.25	0.75
b)		test	global	0.82++	0.05+	0.82+	0.05	0.80	0.07	
				0.04++	0.09+	0.04+	0.09	0.04	0.09	
			test	per	0.94++	0.06++	0.94	0.06	0.92	0.08
				class	0.27++	0.73++	0.24++	0.76++	0.27	0.73

et finalement peu de données. Une classification brute en classant uniquement sur les MSN conduirait à un taux de bonne classification de 87 %, la proportion de MSN dans notre base de données. Cependant, si on ne considère que les INs le taux de bonne classification n'est que de 73 %, ce qui indique que cette classification reste difficile avec les caractéristiques retenues. Nous avons proposé de travailler uniquement sur des classifieurs par analyse discriminante quadratique, qui sont pratiques, car l'estimation de leurs paramètres est très rapide et ils permettent de tester beaucoup d'hypothèses, mais d'autres classifieurs et prétraitements devraient conduire à de meilleures performances. On peut remarquer que lors de la recherche des meilleurs caractéristiques, le nombre de données est faible et que le nombre de caractéristiques devient vite grand, conduisant à une estimation qui peut être mauvaise des matrices de covariances. Là encore d'autres classifieurs devraient conduire à de meilleures performances.

Concernant le choix des caractéristiques, nous avons choisi d'utiliser celles couramment utilisées par les biologistes et d'autres études [11]. D'autres caractéristiques fréquentielles pourraient permettre de discriminer les IN sans mettre en place la procédure proposée dans cette étude. Il serait intéressant de confronter celle-ci avec des bandes de fréquences généralement utilisées en neurologie [12], d'extraire d'autres paramètres associés à l'activité neuronale [13] ou d'utiliser des méthodes qui travaillent directement sur la détection des neurones à partir des vidéos [14].

Le critère de sélection des caractéristiques a été réalisé en ne considérant que les performances AUC. Cependant, les caractéristiques X 0, X 0 MAX, sont dépendantes de la durée entre stimulations et indiquent si la cellule est revenue à son état initial au bout des 10 s, durée entre deux stimulations. Si d'autres paramètres de stimulations sont utilisés, il faudrait certainement retenir des caractéristiques indépendantes de la stimulation.

4 Conclusion

La discrimination de neurones de type MSN et IN à partir de signaux calciques est envisageable avec un taux d'erreurs sur

les IN d'environ 25% et de 10% sur les MSN en utilisant le classifieur proposé.

Références

- [1] C. Grienberger et A. Konnerth, *Imaging Calcium in Neurons*, Neuron, 73 : 862–885, 2012.
- [2] H. H. Yin, et B. J. Knowlton, *The role of the basal ganglia in habit formation*, Nat. Rev. Neurosci., 7 : 464–476, 2006.
- [3] P. Redgrave et al. *Goal directed and habitual control in the basal ganglia*, Nat. Rev. Neurosci., 11 : 760–772, 2010.
- [4] J. Tepper et al., *Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons*, Front. Neuroanat., 4 (150) : 1–18, 2018.
- [5] A. Jain et al., *Statistical Pattern Recognition : A review*, IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell., 22 : 4–37, 2000.
- [6] T. Hastie et al., *The elements of statistical learning*, Springer, 2001.
- [7] J. Schindelin et al., *Fiji : an open-source platform for biological-image analysis* Nat. Methods, 9(7) : 676–682, 2012.
- [8] S. van der Walt et al. *scikit-image : image processing in Python*, PeerJ, 2 : e453, 2014.
- [9] T. W. Chen et al., *Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity*, Nature, 499 : 295–302, 2013.
- [10] F. Pedregosa et al., *Scikit-learn : Machine Learning in Python*, J. Mach. Learn. Res., 12 : 2825–2830, 2011.
- [11] T. P. Patel et al., *Automated quantification of neuronal networks and single-cell calcium dynamics using calcium imaging*, J. Neurosci. Meth., 243 : 26–38, 2015.
- [12] F. Varela et al., *The brainweb : phase synchronization and large-scale integration*, Nat. Rev. Neurosci., 2 : 229–239, 2001.
- [13] T. Deneux et al., *Accurate spike estimation from noisy calcium signals for ultrafast three-dimensional imaging of large neuronal populations in vivo*, Nat. Commun., 7 : 12190, 2013.
- [14] A. Petersen et al., *SCALPEL : Extracting neurons from calcium imaging data*, Ann. Appl. Stat., 12(4) : 2430, 2018.