

Extraction automatique d'objets cellulaires en imagerie médicale microscopique : une approche intégrant les contours actifs avec des informations contours et régions

S.Schüpp A.Elmoataz R.Clouard D.Bloyet
Groupe de Recherche en Informatique, Image et
Instrumentation de Caen, UPRESA CNRS 6072
GREYC – ISMRA
6 Bd Maréchal Juin, F-14050 Caen, France
Abder.elmoataz@greyc.ismra.fr
Pôle de traitement et d'analyse d'image de
Basse-Normandie

P. Herlin
Service d'Anatomie Pathologie, Centre François
Baclesse
Route de Lion sur mer 14021 Caen, France.
p.herlin@baclesse.fr
Pôle de traitement et d'analyse d'image de
Basse-Normandie

Abstract

We present a general method of segmentation integrating active contours with information of contours and regions. An automatic and robust initialisation is proposed in order to detect a set of seeds inside of all objects of image. These seeds are classified according to their intensity or colour in several groups. Then, the set of boundaries of these seeds evolves simultaneously under constraints associated to contours and regions in order to localise the final contours of all objects in image. The implementation of multiple evolution of all contours is made by level set method with fast marching method. This method is well suited with a large class of images in medical microscopic imaging. We illustrate the application with quantification of immunostaining. This example of image analysis is representative of problems in quantitative segmentation.

Résumé

Nous présentons une méthode de segmentation générale intégrant les contours actifs avec des informations contours et régions. Une initialisation automatique et robuste est proposée pour détecter un ensemble de germes à l'intérieur de tous les objets dans une image. Ces germes sont classés en fonction de leur intensité ou de leur couleur en plusieurs groupes. Ensuite l'ensemble des frontières de ces germes va évoluer simultanément sous des contraintes associées aux contours et régions pour localiser les contours finaux de tous les objets dans une image. L'implémentation de l'évolution multiple de tous les contours est mise en œuvre par la méthode des ensembles de niveaux à progression rapide. Cette méthode est bien adaptée, pour une large classe d'images en imagerie microscopique médicale. Nous illustrons son application avec la quantification des immunomarquages, un exemple d'analyse d'images représentatif des problèmes que nous traitons en segmentation quantitative.

Mots clés

Segmentation, contours actifs, méthodes des ensembles de niveau à progression rapide, microscopie médicale, histologie, images couleur.

1 Introduction

En imagerie médicale microscopique, l'analyse d'images offre au pathologiste un outil de quantification moderne adapté à plusieurs problématiques : la quantification du contenu en ADN [8][12], la quantification des immunomarquages, le comptage des mitoses, la quantification et l'analyse de l'architecture tissulaire [2][9]. L'introduction d'un tel outil fondé sur l'analyse d'images implique l'automatisation complète et la standardisation des méthodes de mesures qui va de pair avec une évaluation de l'intérêt clinique des paramètres mesurés. Une des étapes cruciales de l'analyse est la segmentation d'images pour l'extraction automatique des objets cellulaires sur lesquelles on doit faire les mesures. Dans la plupart des cas, la segmentation concerne la mise en évidence de noyaux cellulaires ou de groupements de noyaux cellulaires dans des images 2D (en niveau de gris ou couleur) ou des images 3D issues de la microscopie confocale.

Le choix des opérateurs de segmentation en imagerie médicale microscopique, demeure un problème complexe. D'une part, les structures biologiques observées sont très variables (nature des organes, mode de préparation, grossissement utilisé, phénomène à quantifier tant au niveau des cellules que des tissus). D'autre part, il n'existe pas de méthodes " universelles " de segmentation, mais des techniques générales, que l'on adapte pour les appliquer à un problème donné, selon la classe d'images et le but à atteindre. Cependant, indépendamment du problème d'analyse posé, on peut les classer en plusieurs catégories : méthodes locales orientées contours [4], méthodes

orientées régions, méthodes variationnelles [15] telles que celles basées sur l'optimisation globale de fonctionnelles ou de critères bayésiens, ou celles celle utilisant les modèles des contours actifs [10][11]. On voit apparaître également des méthodes générales intégrant et unifiant explicitement plusieurs de ces approches [18][20][23].

Dans cet article, nous proposons une méthode de segmentation intégrant les modèles déformables avec des informations statistiques d'intensité ou de couleur. Un algorithme d'initialisation robuste et automatique est utilisé pour détecter à l'intérieur des objets intéressants dans l'image, un ensemble de contours initiaux, et les classer en fonction de leur intensité ou de leur couleur. Ensuite, l'ensemble de ces courbes initiales va se déplacer simultanément sous l'influence des contraintes associées aux contours et régions pour localiser les contours finaux de tous les objets dans l'image. L'implémentation rapide et les changements de topologie sont naturellement traités grâce à la mise en œuvre par la méthode rapide des ensembles de niveaux à progression rapide [22]. La première partie de l'article est consacrée à une présentation générale de l'approche géométrique des contours actifs. Dans la seconde partie, nous présentons la méthode de segmentation. La dernière partie est consacrée à l'application de la méthode sur un problème représentatif qui est la quantification d'immunomarquage sur des images couleur de tissus histologiques. En effet, pour ce problème, on a besoin d'une segmentation adaptée, tant au niveau cellulaire, qu'au niveau tissulaire.

2 Approche géométrique des contours actifs

Les contours actifs ou "Snakes" ont été introduits par Kass [10]. Ils se présentent comme un modèle d'extraction des contours des objets dans une image sur la base de la minimisation d'une fonctionnelle énergie. Ce modèle a été largement utilisé en imagerie médicale pour la représentation des formes, la segmentation ou la visualisation d'objets. L'idée de base est de positionner dans une image U_0 , au voisinage de la frontière physique de l'objet à détecter une courbe initiale C_0 (ou surface) et de la déformer par la minimisation de la fonctionnelle énergie, jusqu'à ce qu'elle coïncide avec la frontière de l'objet. Cette approche ne permet pas de gérer facilement les changements de topologie. Le modèle géométrique des contours actifs permet de lever cet inconvénient. Il est basé sur des équations d'évolutions des courbes planes ou surfaces et, pour leur résolution, sur l'utilisation de la méthode des ensembles de niveaux introduite par Osher et Sethian [17]. Dans ce modèle, les contours ou surfaces recherchés sont considérés comme des ensembles de niveau d'une fonction définie sur le support de toute l'image. On transpose de ce fait l'étude des contours (surfaces) à celle d'une fonction. Caselles et al. [6], Malladi et Sethian [13] ont été les premiers à introduire ce modèle pour l'extraction d'objets. Ces modèles ont été ensuite

largement étudiés et utilisés en 2D, 3D et en couleur. Un exemple de modèle communément utilisé est le modèle des contours actifs géodésiques définie par l'équation suivante :

$$\begin{aligned} \frac{\partial \phi}{\partial t} &= g(U_0)[\kappa + \nu]|\nabla \phi| + \nabla g \cdot \nabla \phi \quad (1) \\ \phi(., t = 0) &= \phi_0 \end{aligned}$$

Dans ce modèle ν est un terme constant pour forcer l'évolution dans une direction donnée. κ désigne la courbure en point donné, c 'est un terme régularisant. g est un terme dépendant de l'image, il est utilisé pour arrêter l'évolution des contours. Le facteur d'arrêt communément

utilisé est défini par : $g(U_0) = \frac{1}{1 + |\nabla U_1|^2}$, U_1 étant une

version régularisée de l'image initiale U_0 . La fonction g peut être choisie pour intégrer également d'autres informations statistiques sur les niveaux de gris ou la texture des régions définies par les contours en cours d'évolution.

Contrairement au modèle des Snakes, les modèles géométriques sont stables et, grâce à leur implémentation par la méthode des ensembles de niveaux, permettent de gérer automatiquement sans aucune difficulté les changements de topologie, comme la fusion ou la division de plusieurs contours. Cependant, malgré les améliorations apportées, quelques difficultés subsistent lorsque l'on veut appliquer ces approches en segmentation quantitative sur des images de cytologie ou d'histologie.

a) Comme les « snakes » classiques, ils nécessitent une initialisation automatique des courbes initiales. Le résultat de la segmentation est moins sensible à la position des courbes initiales. Elles peuvent être plus loin des contours physiques des objets que dans les Snakes. Mais la localisation des objets reste sensible à la bonne répartition des courbes initiales à l'intérieur des objets. Elle peut être meilleure si ces courbes initiales sont placées symétriquement par rapport aux contours physiques des objets.

b) Dans le modèle défini par l'équation (1), comme dans tous les modèles géométriques utilisant l'évolution des courbes avec la méthode des ensemble de niveaux, la fonction ϕ_0 est souvent choisie comme la distance signée de tous les points de l'image à l'ensemble des courbes initiales C_0 . Il est nécessaire de maintenir au cours de l'évolution les fonctions de niveaux $\phi(., t)$ comme des fonctions distances. Bien qu'il existe des méthodes locales rapides permettant la résolution des équations de type (1), tout en maintenant les fonctions de niveaux comme des fonctions distances [14], ces méthodes restent coûteuses en temps de calcul pour des applications en cytologie et histologie quantitative.

d) Le choix de critères de convergence lors de la résolution des équations de la forme (1) est déterminant

pour arrêter l'évolution des contours, en particulier, pour stopper l'évolution des contours, on utilise un critère global, ou on fixe le nombre d'itérations, ce qui pose un problème de localisation en présence de différents objets avec des contrastes différents. Il subsiste également un problème, ces méthodes ne permettent pas de bien localiser les objets se touchant. Le plus difficile est de réaliser une partition de l'image en faisant évoluer des courbes à l'intérieur de chaque objet de l'image.

3 Méthode proposée

La méthode de segmentation que nous présentons est basée sur deux étapes :

Une première étape d'initialisation automatique des contours actifs, consiste à détecter un ensemble de germes, répartis d'une manière symétrique à l'intérieur de tous les objets intéressants dans l'image. Ensuite en exploitant les informations statistiques d'intensité ou de couleur, tout ou une partie des germes sont regroupés en ensembles de germes en utilisant une méthode de classification floue supervisée.

Une deuxième étape de localisation de tous les contours d'objets. Il s'agit à partir d'un ensemble de germes de considérer les frontières de ces germes comme contours initiaux. Ensuite les faire évoluer simultanément de l'intérieur vers l'extérieur en fonction de contraintes locales et régionales sur les régions qu'elles englobent. A cette étape aucun critère de contrôle d'évolution n'est utilisé. L'algorithme utilisé pour réaliser cette évolution multiple des contours est une adaptation de la méthode des ensembles de niveau à progression rapide [22].

3.1 Initialisation automatique

L'initialisation automatique est simple et générale. Elle est basée sur la détection des extrema locaux et les zones plates dans une image [22]. Ceci peut s'obtenir d'une manière simple par les *h-minima* et les *h-maxima* d'une hauteur *h*. Les *h-minima* d'une image d'intensité U_0 sont définis de la manière suivante :

$$h_{\min}(U_0) = \{P / (U_0(P) - \gamma^{(rec)}(U_0, U_0 + h)(P)) < 0\}$$

où $\gamma^{(rec)}(U_0, U_0 + h)$ désigne la reconstruction géodésique par érosion de l'image $U_0 + h$ dans l'image U_0 et *h* est la hauteur des minima régionaux. D'une manière analogue en utilisant la reconstruction géodésique par dilatation d'une image $U_0 - h$ dans une image U_0 , on obtient les maxima régionaux de U_0 . Les extrema peuvent être appliqués à une image couleur, en considérant la composante intensité définie par la somme des ses trois composantes. Les zones plates d'une image s'obtiennent en considérant les *h-minima* de l'amplitude du module du Gradient de cette image. Les extrema régionaux et les zones plates dans une image, utilisent des informations de

contraste et de taille, et permettent d'avoir une bonne répartition de germes à l'intérieur de tous les objets dans l'image.

En imagerie microscopique médicale, dans les images observées, on distingue deux ou trois classes d'objets : un fond et des objets cellulaires (cytoplasmes et noyaux). Le fond est caractérisé par l'intensité, la couleur et une texture plus au moins homogène. Les cytoplasmes sont caractérisés surtout par leur couleur et texture, quant aux noyaux, ils se distinguent du fond et des cytoplasmes par leur taille, leur forme et des statistiques moyennes d'intensité ou de couleur. Ils peuvent former des groupements plus au moins complexes. Une classification globale utilisant l'intensité ou la couleur, nous permet alors de classer et de grouper tous les germes détectés en plusieurs classes. La méthode de classification utilisée est la classification floue supervisée [3].

A la fin de cette étape, on a un ensemble de germes initiaux, classés en *K* groupes (*K* est connu a priori) avec leurs moyennes en niveau de gris ou en couleur.

3.2 Evolution multiple des courbes initiales

Dans le cas d'une évolution simple des contours, ces derniers sont représentés par une seule fonction de niveau $\phi(., t)$. Considérons la version non régularisée du modèle géométrique défini par l'équation (1) :

$$\begin{aligned} \frac{\partial \phi}{\partial t} &= g(\nabla U_0) |\nabla \phi| \quad (2) \\ \phi(., t = 0) &= \phi_0 \end{aligned}$$

Il est intéressant de noter que l'équation (2) peut s'implémenter par des algorithmes très rapides en considérant l'équation eikonale, dont elle est la version stationnaire :

$$|\nabla T| = \frac{1}{g(U_0)} \quad (3)$$

$$T = 0 \text{ sur } G_0$$

$T(x, y) = t$ est le temps de passage par zéro de la fonction de niveau $\phi(x, y)$. G_0 est la région de frontière C_0

Quand $g(U_0) = 1$ l'équation (2) apparaît comme une dilatation continue des courbes initiales. Les valeurs de *T* fournissent une bonne approximation de la distance euclidienne des points à la frontière C_0

Quand $g(U_0) = \frac{1}{|\nabla U_0|}$ et que les courbes initiales, coïncident avec les minima régionaux de $|\nabla U_0|$, l'équation (2) devient une implémentation de la ligne de partage des eaux (LPE) classique définie comme un squelette de zones d'influence de tous les minima régionaux relativement à une distance pondérée

dépendante de $|\nabla U_0|$ [16].

Lorsque les courbes initiales ne coïncident pas avec les minima régionaux, il est possible de les imposer comme minima du module du Gradient par changement d'homotopie. On aboutit alors à la LPE continue, contrainte par des marqueurs.

Dans le cas, où l'on considère $g(U_0)$ comme une fonction dépendant de critères statistiques quelconques, l'équation (2) permet d'implémenter des procédés de croissance de régions.

L'équation (3) peut être étendue pour réaliser l'évolution simultanée de multiples contours. Considérons tous les germes détectés, regroupés en K ensembles de germes pas nécessairement connexes : $G_i, i=1,2,..K$. Chaque ensemble de germes G_i , est caractérisé par sa moyenne en niveaux de gris ou en couleur obtenue par classification à l'étape d'initialisation : M_i . L'évolution simultanée de tous les contours des germes est réalisée en considérons l'équation .

$$|\nabla T| = \frac{1}{g(U_0)} \quad (4)$$

$$T = 0 \text{ sur } G_i, i = 1,..K$$

Dans ce cas la vitesse d'évolution de chaque contour est dépendante des statistiques moyennes de l'intensité ou de la couleur de chaque germe, ainsi que du gradient en chaque point de son contour. Cette vitesse est définie par :

$$g^i(U_0)(P) = 1 - e^{-\frac{1}{2}(|U_0(P) - M_i|^2 + |\nabla U_0(P)|^2)}$$

La résolution de (4) est faite avec une petite modification de la méthode des ensembles de niveaux à progression rapide de Sethian [22]. Tous Les ensembles de Germes G_i sont labélisés au départ. T étant une distance pondérée de tous les points de l'image à l'ensemble des germes, pour chaque point P des frontières de G_i en cours d'évolution, on calcule la valeur de T , ensuite on lui donne le label du point le plus proche appartenant aux germes, c'est-à-dire ayant la valeur de T la plus proche de $T(P)$. A la fin tous les points de l'image auront les labels des germes les plus proches, et aucun contrôle de l'évolution des contours n'est nécessaire.

Cette méthode d'évolution multiple de contours présente des intérêts dans notre domaine d'application en imagerie médicale microscopique. Elle permet, en choisissant dans l'équation (4) les vitesses d'évolution g^i toutes égales à 1, d'obtenir d'une manière simple et rapide les diagrammes de Voronoï d'une population d'objets. En effet pour l'étude de l'architecture cellulaire, on a besoin de définir des relations de voisinages dans une population de cellules, ce qui passe par le plus souvent par le calcul du diagramme de Voronoï de cette population. Elle permet également d'intégrer facilement le résultat d'une autre segmentation, en modifiant la valeur de des g^i aux points

correspondants aux contours obtenus par la segmentation en question.

4 Spécification du problème de l'immunomarquage nucléaire et nature des images

Pour le problème d'immunomarquage, on s'intéresse à des images colorées, correspondant à des sections histologiques fines ($5 \mu\text{m}$) de tissu tumoral, fixé au formol et inclus en paraffine. Ces sections sont placées sur une lame de verre afin d'être mises en présence d'un marqueur immunohistochimique (c'est-à-dire d'un anticorps spécifique de la protéine que l'on cherche à quantifier dans la tumeur). Les noyaux colorés en brun sont obtenus par immunodétection d'une protéine associée à la prolifération (Ki67), révélée par l'immunopéroxydase. Les noyaux non marqués sont contre-colorés en bleu par l'hématoxyline de Harris. Un grossissement (X33) est utilisé pour permettre d'étudier le marquage nucléaire, et de distinguer dans l'image les lobules tumoraux. Les images obtenues sont des images couleur avec plusieurs types d'objets : des massifs de cellules tumorales, des nappes de tissu de soutien et des cellules inflammatoires infiltrées (Fig.1.). L'objectif de l'analyse consiste à mesurer un indice de prolifération tumorale qui est égal à la surface des noyaux marqués par rapport aux noyaux tumoraux totaux. Dans certaines situations, on doit limiter la mesure à l'intérieur de groupements de cellules tumorales (lobules) et quantifier la répartition du marquage à l'intérieur de ces lobules. Une automatisation complète de ce processus nécessite une segmentation précise et adaptée tant à l'échelle tissulaire (identification des lobules) que cellulaire (identification des cellules marquées et non marquées).

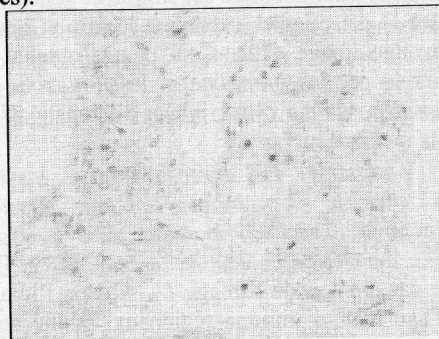


Figure .1.a)

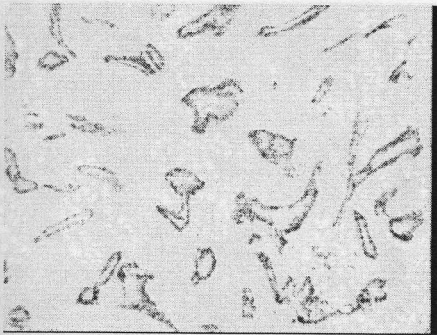


Figure .1.b)

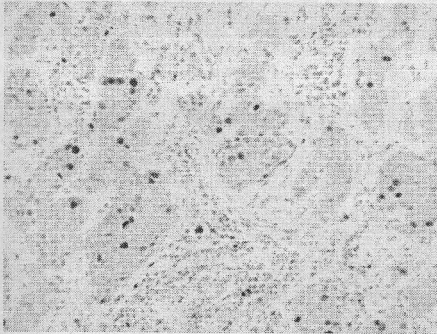


Figure .1.c)

Figure 1: images couleur d'histologie a) faible marquage b) fort marquage c) faible marquage avec une forte infiltration de lymphocytes

4.1 Extraction des lobules

Les lobules sont des groupements de cellules caractérisées par une faible distance intercellulaire et par la taille importante de leur noyau par rapport à d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes. Dans une image, il existe parfois une quantité assez importante de lymphocytes constituant eux-mêmes des amas. La distance intercellulaire n'est plus un critère suffisant pour discerner les lobules. Il faut donc éliminer les lymphocytes et à fortement régulariser l'image pour favoriser les groupements de noyaux. Le plan de segmentation adopté est le suivant:

a) Initialisation automatique

Pour éliminer les lymphocytes, on utilise une fermeture morphologique couleur $\gamma_B = \lambda_B \cdot \varepsilon_B$ où λ_B et ε_B sont la dilatation et l'érosion avec un élément structurant plan B . L'élément structurant adapté pour cette application est un disque de rayon 3, connue a priori en fonction de la taille moyenne des lymphocytes.

On obtient une image U_1 , pour favoriser les groupements des cellules tumorales, on effectue sur U_1 une forte simplification de l'image par diffusion non linéaire [1] sur chaque composante de l'image couleur, ce qui permet d'obtenir une image U_2 . Enfin Les h-extrema (h=2) sur l'image d'intensité (somme des trois composantes), sont calculés et classés en deux classes

(Lobules et fond).

b) Localisation

La localisation est réalisée en choisissant comme vitesse d'évolutions :

$$g^i(U_2)(P) = 1 - e^{-\frac{1}{2} \left(\sum_{k=1}^3 (U_2^k - M_i^k)^2 + |\nabla^C U_2(P)|^2 \right)}$$

$$i = 1, 2$$

U_2^k désigne la composante couleur k de l'image, M_i^k désigne la moyenne de la composante couleur k de la classe i (fond ou lobules), $\nabla^C U$ désigne le Gradient couleur de U .

La figure 2 montre quelques exemples de lobules tumoraux extraits par la méthode.

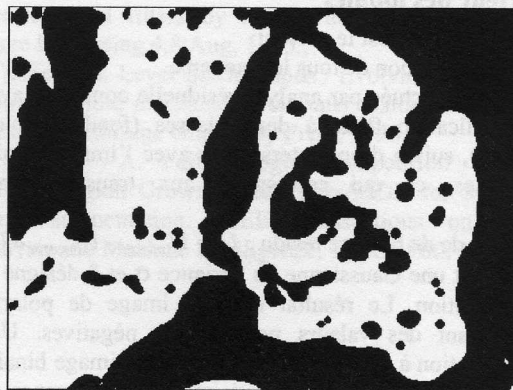


Figure .2.a)



Figure 2.b)

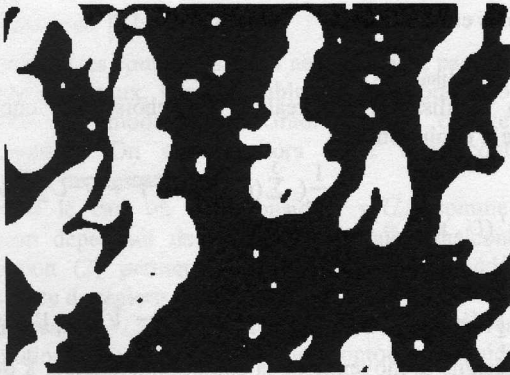


Figure 2.c)

Figure 2: lobules tumoraux des images couleurs de la figure 1 .

4.2 Extraction et individualisation des noyaux à l'intérieur des lobules

Le plan adopté est le suivant:

a) L'extraction de tous les noyaux

Elle est effectuée par analyse résiduelle combinée avec une classification floue à deux classes (fond et objets cellulaires), suivie d'une intersection avec l'image binaire des lobules, ce qui correspond aux transformations suivantes :

- Calcul de de l'image résidu : $U_1 = U_{intense} - U_{intense} * G_{\sigma}$, G_{σ} étant une Gaussienne de variance σ et * désigne la convolution. Le résultat est une image de polarité contenant des valeurs positives et négatives. Une binarisation à zéro permet d'obtenir une image binaire U_2 contenant les objets cellulaires, avec des zones du fond correspondant au bruit.
- Extraction du fond par classification floue de l'image initiale ($K=2$), pour obtenir une image binaire U_{fond} .
- Intersection de U_2 et U_{fond} pour obtenir une image de tous les objets cellulaires U_{objest} .

b) Séparation des noyaux qui se touchent.

L'image de distance sur U_{objest} est calculée avec précision en résolvant l'équation (4) avec la vitesse de dévolution g égale à 1. Ensuite on extrait et on labélise tous les h-minima de hauteur $h=2$ de l'inverse de l'image de distance. La localisation se termine par la résolution de l'équation (4) en prenant pour la vitesse d'évolution g l'inverse de la distance. Enfin les noyaux à l'intérieur des lobules sont obtenus par intersection du résultat avec le masque des lobules obtenu en 4.1. La figure 3 (Fig.3.a) illustre un exemple de résultat.

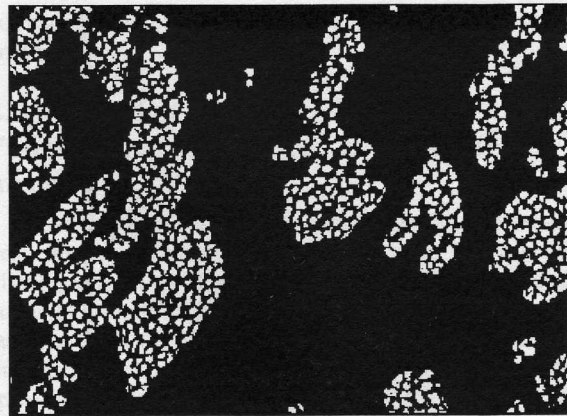


Figure 3 a)

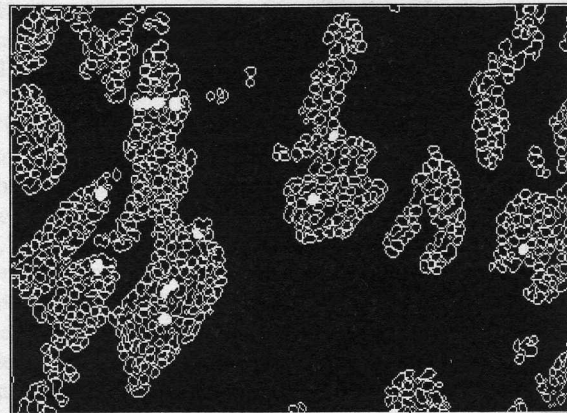


Figure 3 b)

Figure 3 : segmentation et caractérisation des noyaux à faible résolution en limitant l'analyse à l'intérieur des lobules tumoraux a) segmentation des noyaux à l'intérieur des lobules b) caractérisation des noyaux marqués (blancs) et non marqués.

4.3 Caractérisation des noyaux

A cette étape de l'analyse, on a tous les noyaux à l'intérieur des lobules, on veut les identifier en noyaux marqués ou non, une classification couleur floue à deux classes sur l'ensemble des noyaux tumoraux, permet d'identifier les noyaux marqués (Fig.3.b). On peut alors mesurer le rapport en surface des noyaux marqués par rapport à tous les noyaux.

Pour la quantification de l'architecture ou la topographie du marquage. Les noyaux sont considérés comme des objets ponctuels. A l'aide du diagramme de Voronoï de ces objets, on obtient une représentation par graphe. Avec cette représentation, on aboutit différentes caractéristiques intrinsèques (marquage), ou relationnelles (distance entre noyaux, distance entre caractéristiques de noyaux). On peut donc facilement extraire des mesures de topographie du marquage ou de l'architecture cellulaire.

5 Conclusion

Nous avons présenté une méthode générale de segmentation qui intègre les contours actifs multiples avec des informations contours et régions. Cette méthode peut à la fois tenir compte d'informations locales tel que le gradient et d'informations globales tel que la couleur d'une région. De part leur principe, l'initialisation automatique et l'approche géométrique des contours actifs se formulent de façon identique en 2D et 3D et permet de traiter des images en 3D provenant, par exemple, d'un microscope confocal.

6 Références

- [1] L.Alvarez, F.Guichard, P.L.Lions, J.M.Morel. Formalization and computational aspects of image analysis. *Acta Numerica*, 1-61, 1994.
- [2] F. Angot, A. Elmoataz, M. Revenu, P. Herlin. Analysis of cellular microscopy images by means of neighborhood graphs. *Microsc. Microanal. Microstruct.* 7, 549-556, 1996.
- [3] C. Bezdek, L.O. Hall, L. P. Clarke. Review of MR image segmentation techniques using pattern recognition. *Med. Phys.* 20,1033-1048, 1993.
- [4] J.Canny. A computational approach to edge detection. *IEEE Transactions on PAMI*, 6, 679-698, 1986.
- [5] V.Caselles, F.Catte, T.Coll, F.Dibos. A geometric model of active contours. *Numerische Mathematik*, 66, 1-31, 1993.
- [6] V.Caselles, R.Kimmel, G.Sapiro. Geodesic active contour. Presented at Proceeding of Fifth International Conference on Computer Vision, Cambridge, MA. 1995.
- [7] F.Catte, F.Dibos, G.Koepfler. A morphological scheme for mean curvature motion and applications to anisotropic diffusion and motion of level sets. *SIAM J.Numer.Anal.*, 32, 6, 1895-1909, Dec.1995.
- [8] F.Duigou, I.Galle, P.Herlin, A.M.Mandard. Improvement of slide preparation from archival material for automatic DNA measurements by image analysis. Accepted for publication in *Analytical Quantitative Cytology Histology*, 1997.
- [9] A. Elmoataz, S. Schüpp, R. Clouard, P. Herlin, D. Bloyet. Using active contours and mathematical morphology tools for quantification of immunohistochemical images., *Signal Processing*, 71, 215-226, 1998.
- [10] M.Kass, A.Witkin, D.Terzopoulos. Snakes : Active Contour Models. *International Journal Of Computer Vision*, 1, 321-331, 1988.
- [11] S.Kichenassamy, A.Kumar, P.J.Olver, A.Tannenbaum, A.Yezzi. Gradient flows and geometric active contours. Presented at the Proceeding of Fifth International Conference on Computer Vision., 810-815, Cambridge, 1995.
- [12] O. Lezoray, A. Elmoataz, H. Cardot, M. Revenu. A.R.C.T.I.C : un système automatique de tri cellulaire par analyse d'images. *Vision Interface 99*, 312-319, 1999, Trois-Rivières, Canada.
- [13] R.Malladi, J.A.Sethian, B.C.Vemuri. Shape modeling with front propagation : a level set approach, *IEEE Transactions on PAMI*, 17, 158-175, 1995.
- [14] B. Merriman, R. Caflish, S. Osher. Level set methods with an application to modelling the growth of thin films. *UCLA CAM Report 98-10*, 1998.
- [15] J.Morel, S.Soleimani Variational. *Methods in Image Segmentation. Progress in Nonlinear Differential Equations and their application*, Birkhäuser, 1995.
- [16] L.Najman, M.Schmitt. Watershed of a continuous function. *Signal Processing*, 38, 99-112, 1994.
- [17] S.Osher, J.A.Sethian. Fronts propagating with curvature-dependent speed : algorithms based on Hamilton-Jacobi formulations, *Journal of computational physics*, 79, 12-49, 1988.
- [18] N. Paragios, R. Deriche. Geodesic Active regions for motion estimation and tracking. In *IEEE Conference on Computer Vision*, 674-688, 1999, Corfu, Greece.
- [19] K. Rodenacker, P. Bischoff. Quantification of tissue sections : graph theory and topology as modelling tools. *Pattern Recognition Lett.* 11 (4), 275-284, 1994.
- [20] C. Samson, L. Blanc-Feraud, G. Aubert, J. Zerubia : A level set model for image classification, rapport de recherche, INRIA, RR-3662, 1999.
- [21] J.Serra, P. Salembier. Flat zones filtering connected operators and filters by reconstruction. *IEEE Trans.on Image Processing*, 4,8, Aug, 1995.,
- [22] J.Sethian. *Level Set Methods : Evolving interfaces in geometry, fluid mechanics, computer vision, and material science.* Cambridge University Press, 1996.
- [23] S. Zhu, A. Yuille. Region competition : Unifying Snakes, Region Growing, and Byes/MDL for Multiband Image segmentation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 18,884-900, 1996.