

Colloque STAT'IM

Paris – 22 & 23 Janvier 2009

Détection, comptage, extraction et classification de cellules cancéreuses

Équipe TADIB: T.Q SYED, V. VIGNERON, **Sylvie LELANDAIS**, C. MONTAGNE

Équipe DYNAMIC: A. CARTIER-MICHAUD, G. BARLOVATZ-MEIMON, M. MALO, C.
CHARRIERE-BERTRAND

Laboratoire IBISC, CNRS FRE 3190, Université d'Évry val d'Essonne





Plan de la présentation

- Position du problème
- Les images acquises
- Difficultés rencontrées
- Détection et comptage des cellules
- Extraction des vignettes & Classification
- Conclusions & Suites du travail

Plan de la présentation

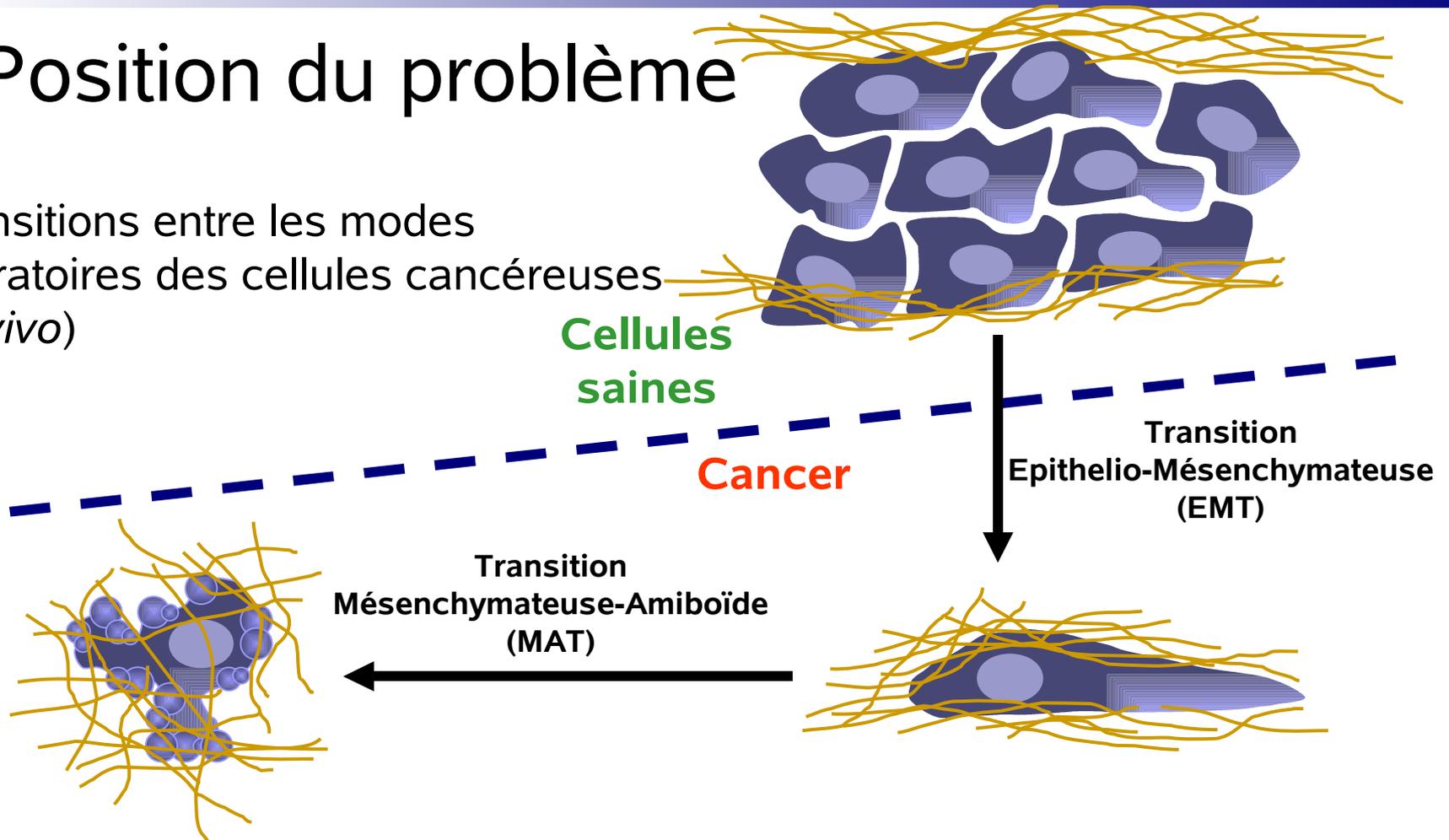
- ***Position du problème***
- Les images acquises
- Difficultés rencontrées
- Détection et comptage des cellules
- Extraction des vignettes & Classification
- Conclusions & Suites du travail

Position du problème

- Travail conjoint entre une équipe de biologistes (DYNAMIC) et une de traiteurs d'images (TADIB)
- **Métastase** : désigne une tumeur secondaire dans un cancer. Elle a été formée par des cellules qui ont **migré** depuis la tumeur primaire et ont proliféré dans un foyer secondaire.
- **Mode migratoire** : deux modes de migration possibles des cellules cancéreuses
 - Mésoenchymateuse
 - Amiboïde

Position du problème

Transitions entre les modes migratoires des cellules cancéreuses (*in vivo*)



Migration amiboïde

- Échappement des cellules
- Pronostic : Métastases
- Morphologie « blebbantes »

Migration mésenchymateuse

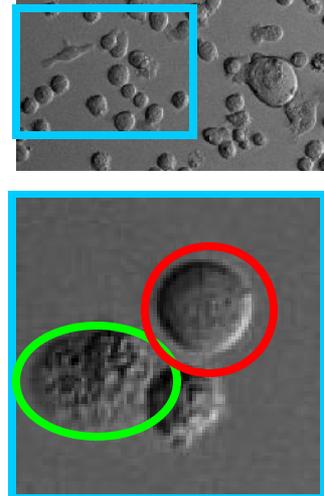
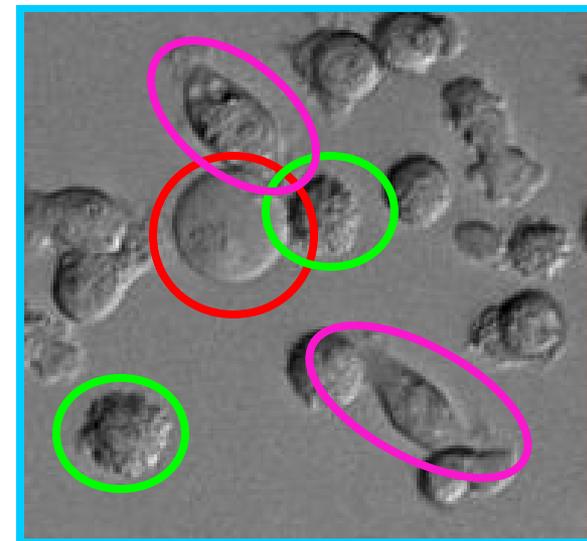
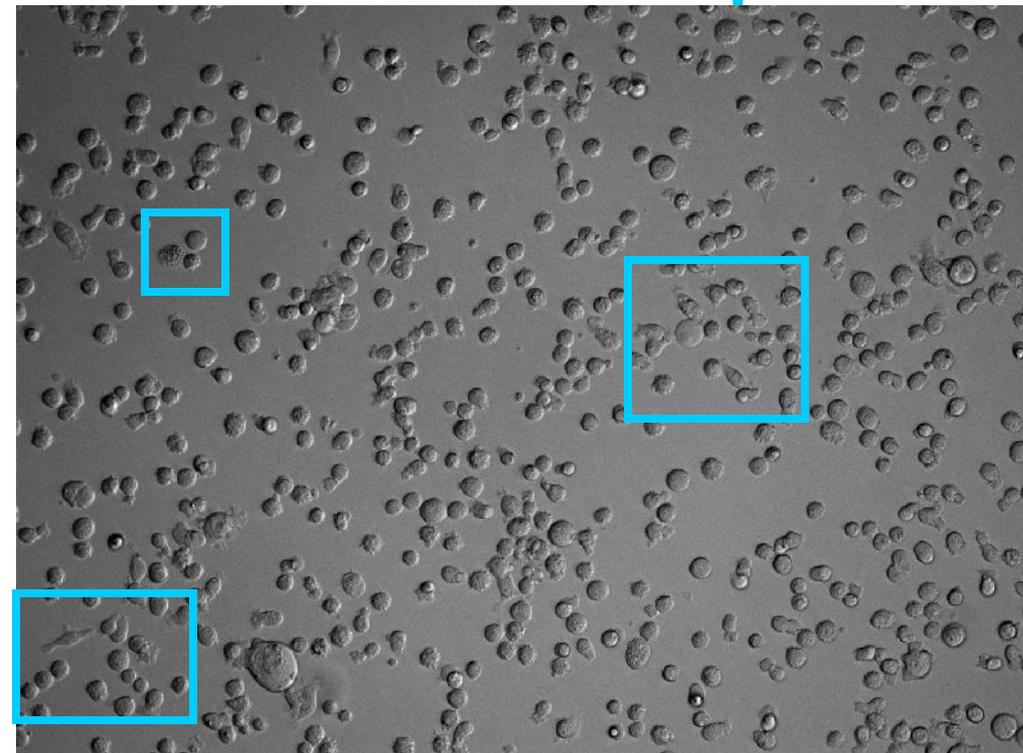
- Prolifération des cellules
- Pronostic: Augmentation de la tumeur
- Morphologie « allongée »

Position du problème

- **Problématique** : quelles sont les conditions environnementales entraînant un changement de mode migratoire?
- **Hypothèse** : l'environnement des cellules favorise la transition Mésenchymateuse/Amiboïde → étude de la molécule PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-type 1)
- **Nécessité** : caractériser *in-vitro* (culture de lignées de cellules cancéreuses) modes migratoires (signalisation, paramètres de migration, adhérence, **morphologie et texture**)
- **Contraintes** : s'adapter aux contraintes des biologistes et à des modes opératoires pouvant évoluer (travail de recherche)

Détection et comptage des cellules

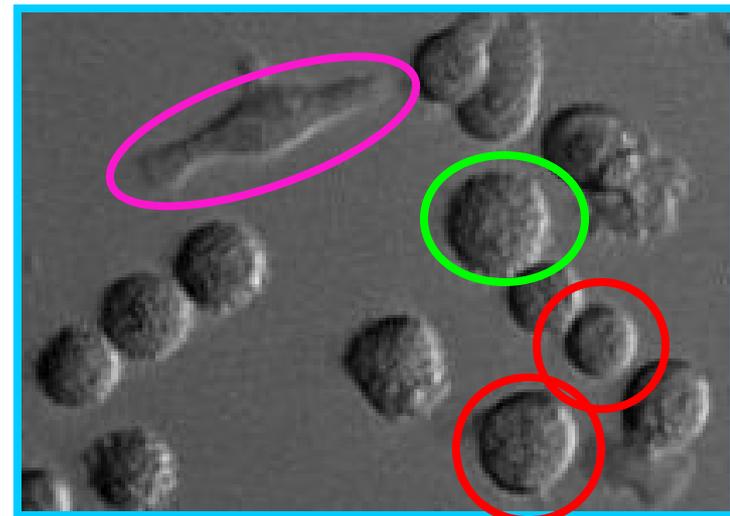
Les données de départ



Cellules lisses

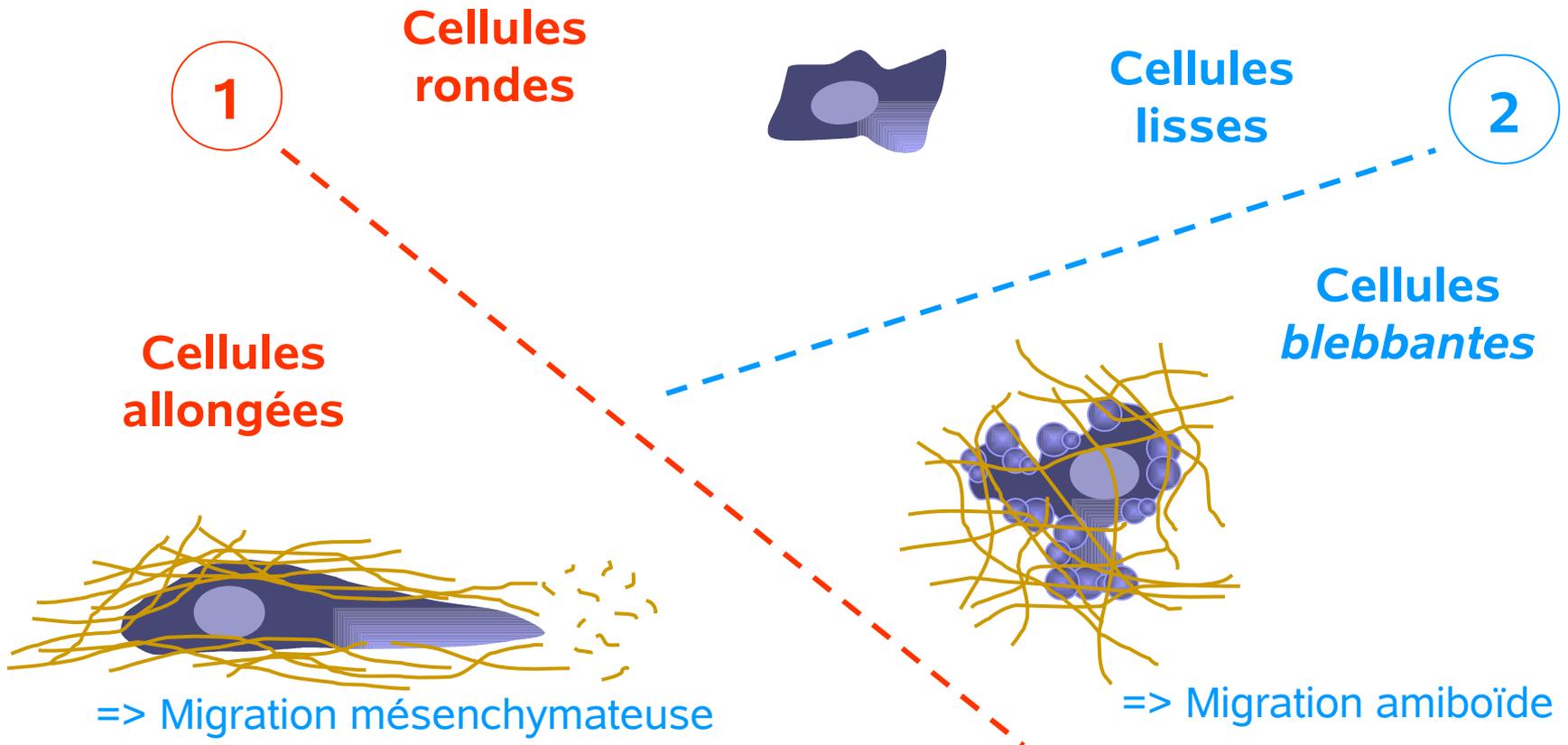
Cellules blebbantes

Cellules allongées



Objectif final de ce travail

- **Objectif** : Compter les cellules et les répartir en trois classes
→ Détecter, localiser et classer les cellules présentes dans l'image



Plan de la présentation

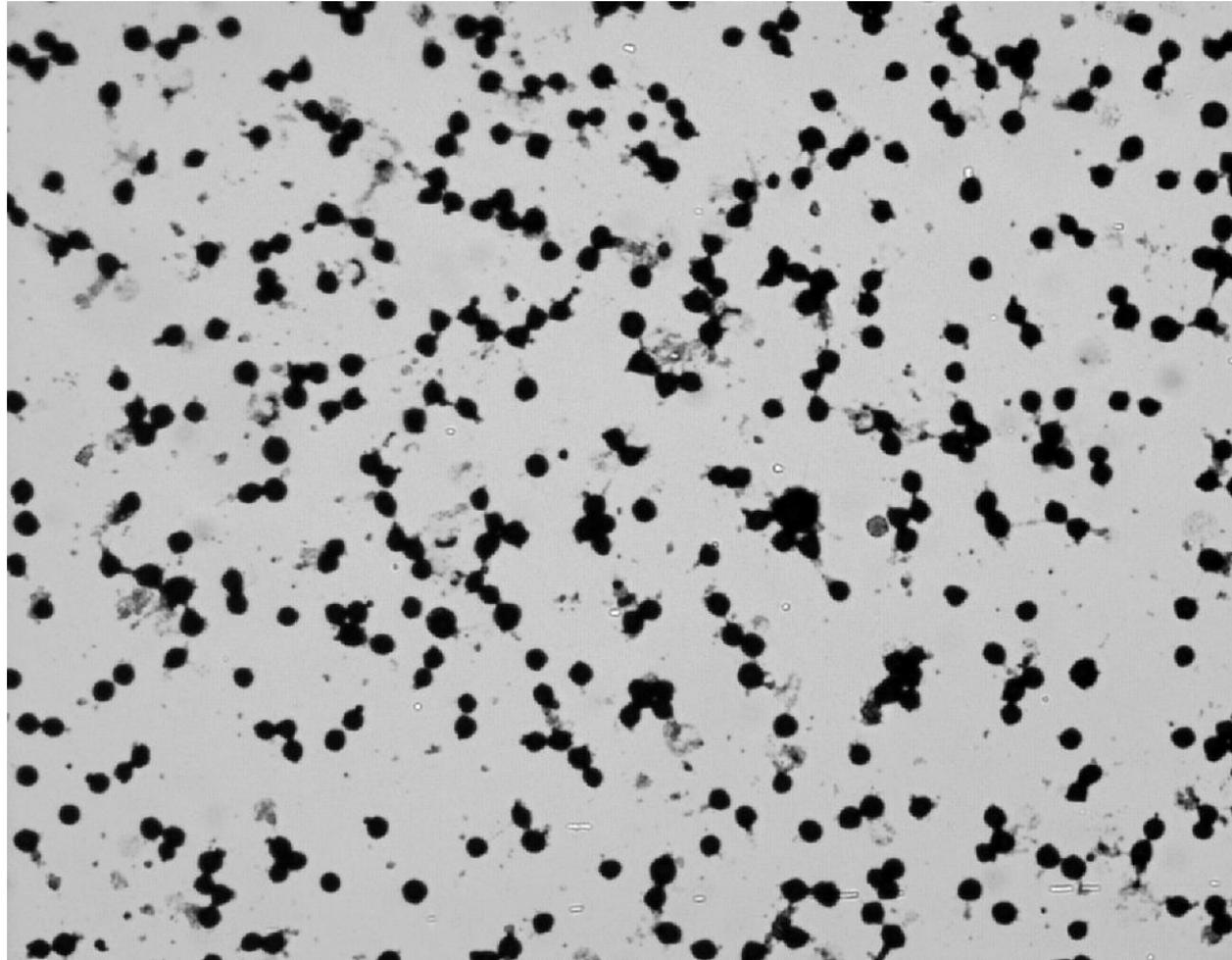
- Position du problème
- ***Les images acquises***
- Difficultés rencontrées
- Détection et comptage des cellules
- Extraction des vignettes & Classification
- Conclusions & Suites du travail

Les images acquises

Premières images

AxioVert 200
ZEISS

Microscopie
photonique après
fixation et
coloration des
cellules



Les images acquises

Nouvelles images

Microscope AxioVert 200
avec chambre d'incubation de la
société ZEISS.

Émulation du
comportement des cellules
vivantes

Images en contraste de
phase

Possibilité d'images en »z »
(système APOTOME)



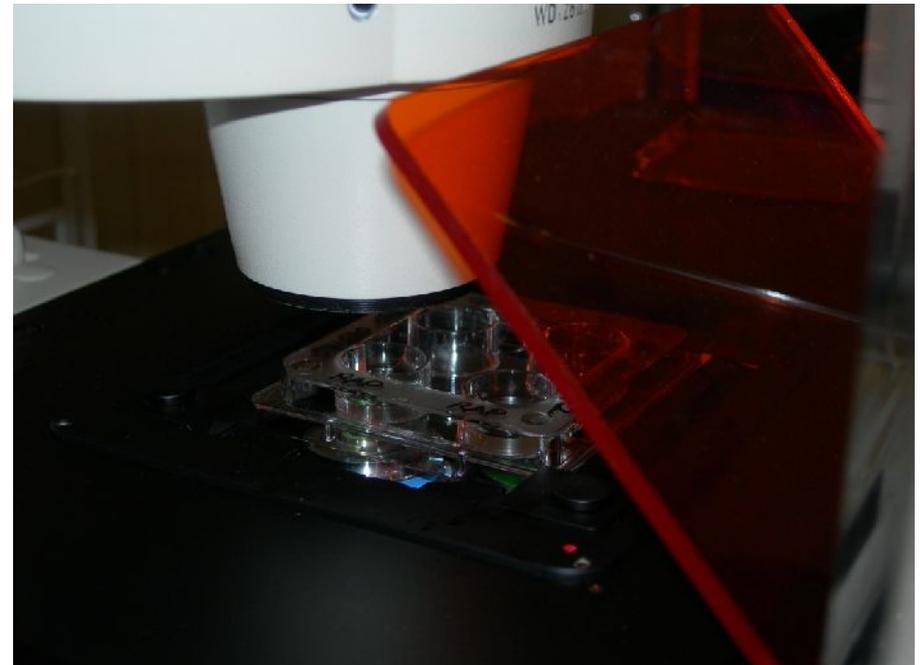
Les images acquises



Les images acquises



Observation avec deux objectifs:
X10 ou X40

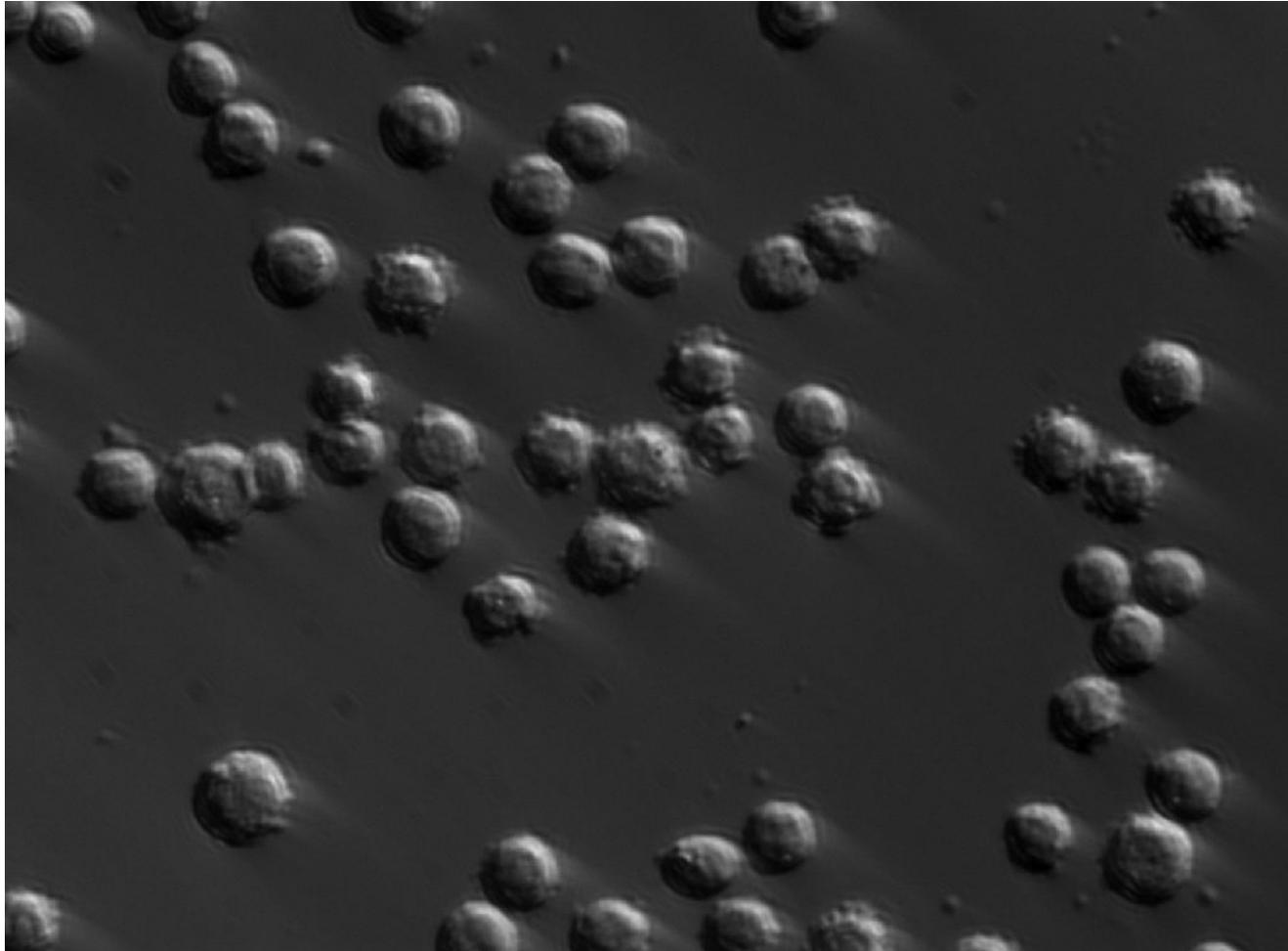


Culture « in vitro ».

4 lames déposées dans 4
puits différents.

Éclairage dévié par les parois
du puits

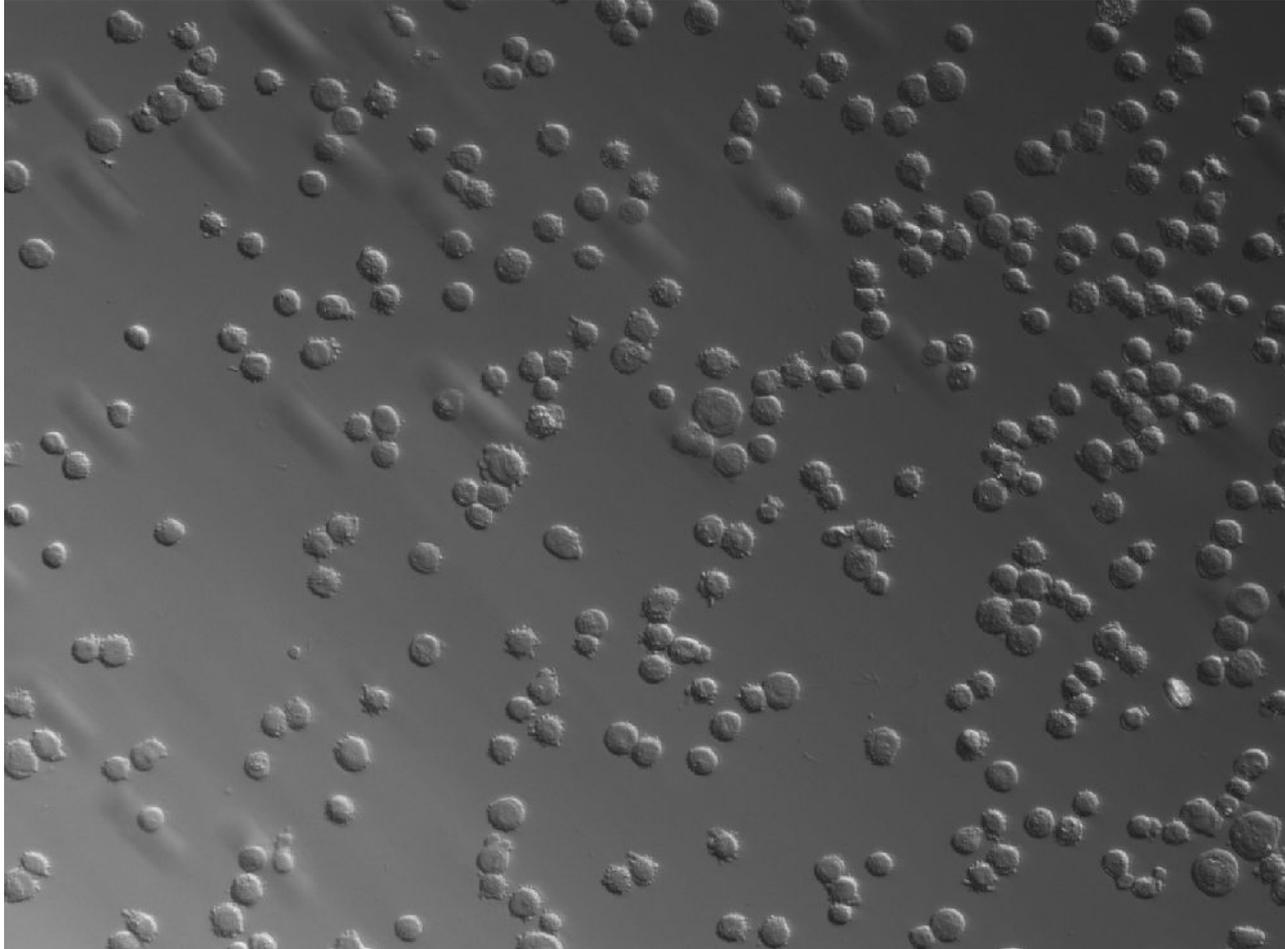
Les images acquises



X40 – lignée cellulaire SW620: Cellules provenant de tumeurs colorectales

Diamètre moyen d'une cellule 10 μm

Les images acquises



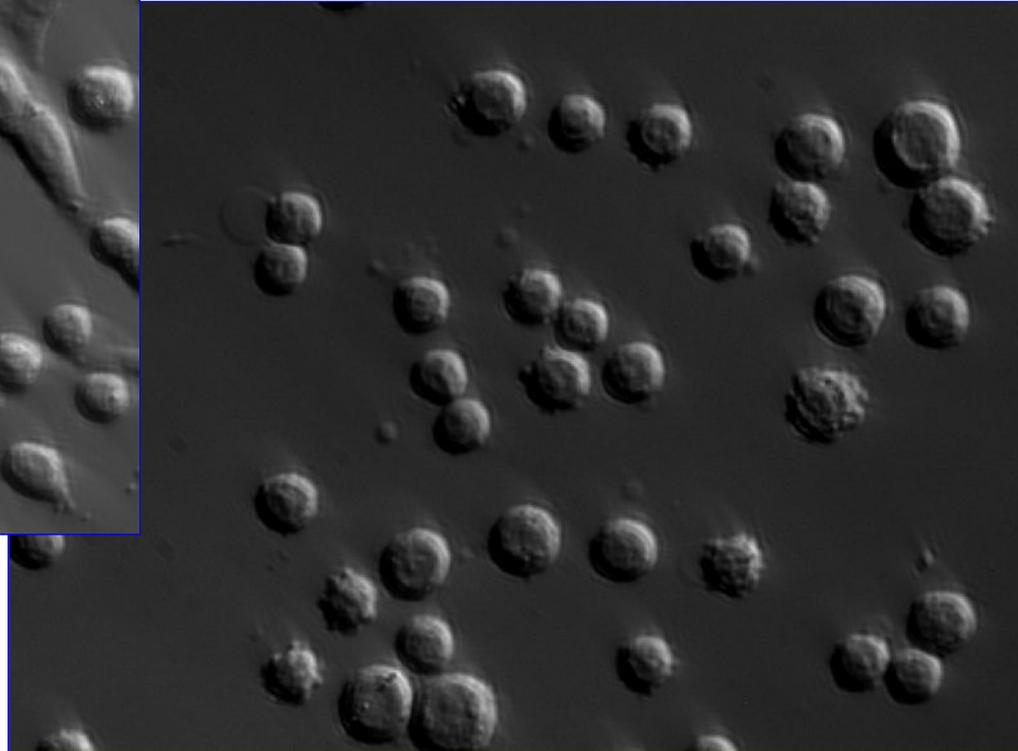
X10 – lignée cellulaire MDA: Cellules provenant de tumeurs mammaires

Diamètre moyen d'une cellule $20\mu\text{m}$

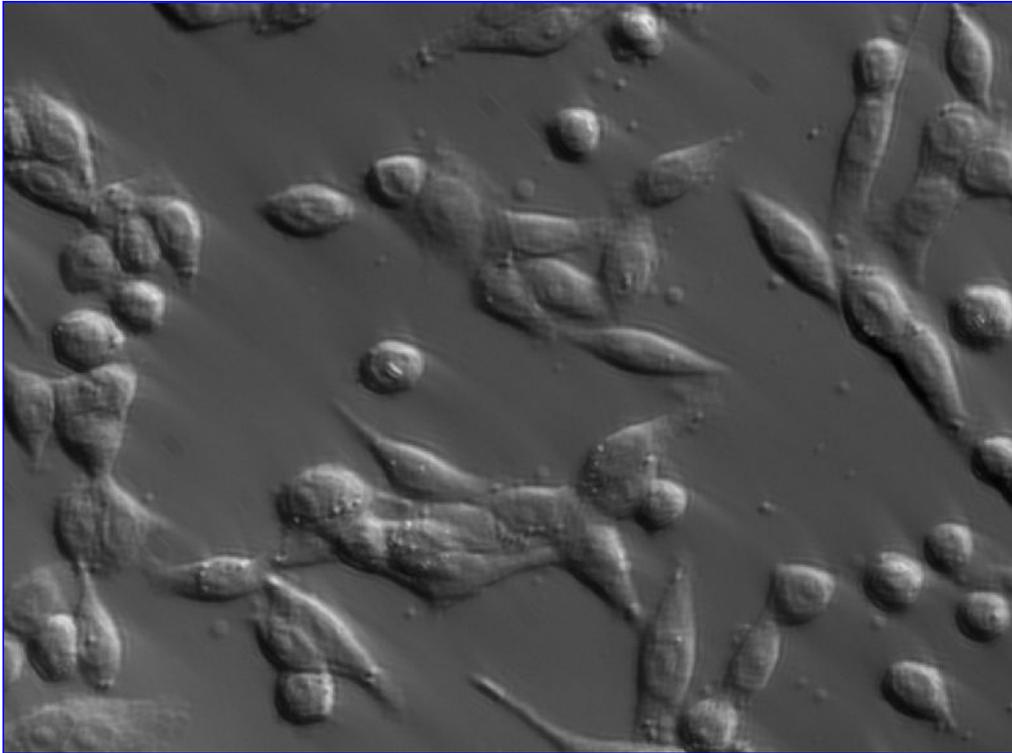
Les images acquises

Deux micro-environnements → Deux comportements cellulaires différents

Lignée cellulaire SW620
PAI-1

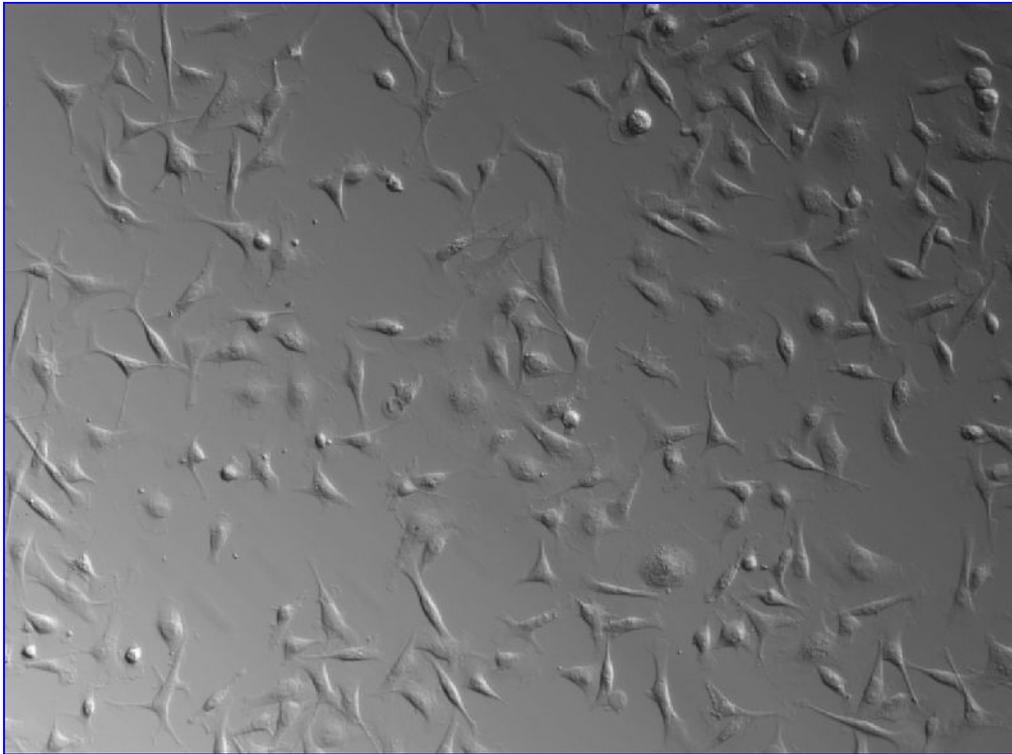


Lignée cellulaire SW620
Collagène



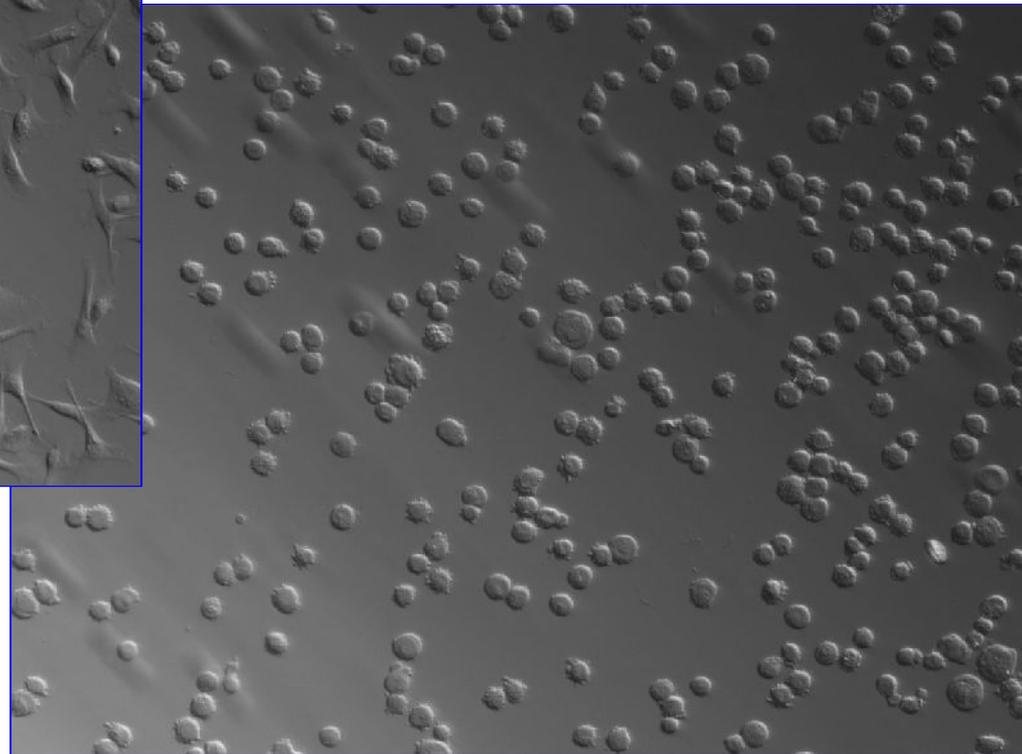
Les images acquises

Deux micro-environnements → Deux comportements cellulaires différents



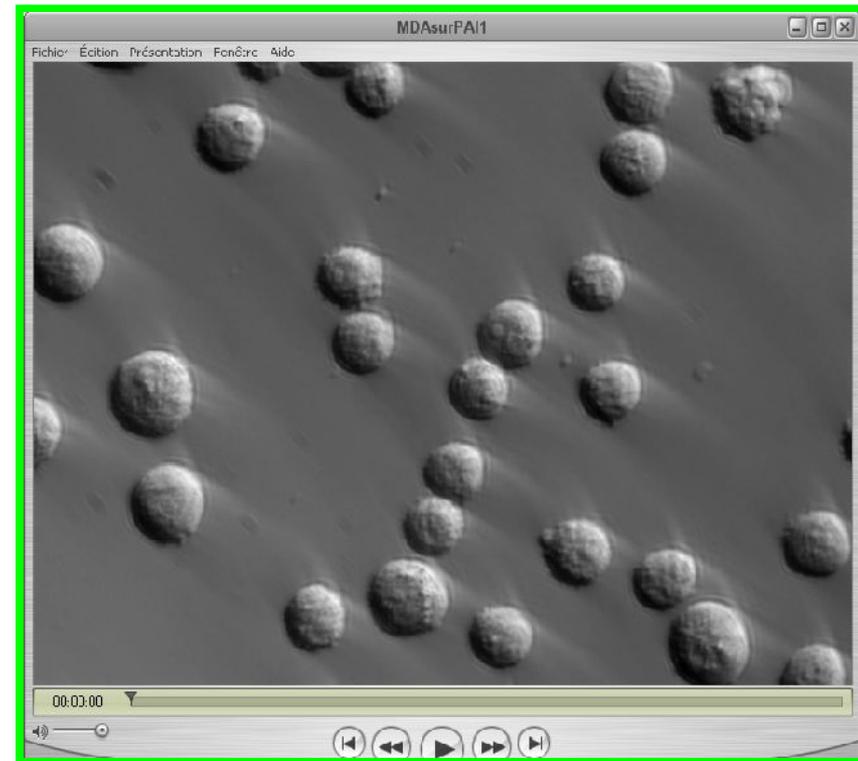
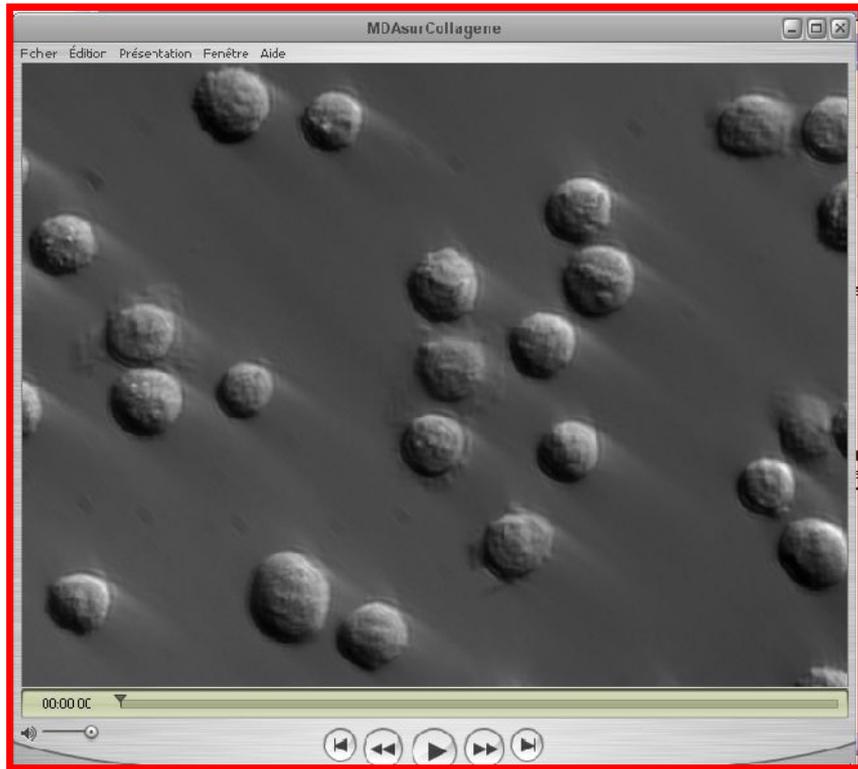
Lignée cellulaire MDA
Collagène

Lignée cellulaire MDA
PAI-1



Les images acquises

Cellules vivantes: Évolution du comportement au cours du temps (360 images acquises à la fréquence de 1 image toutes les 10 secondes pendant une heure)





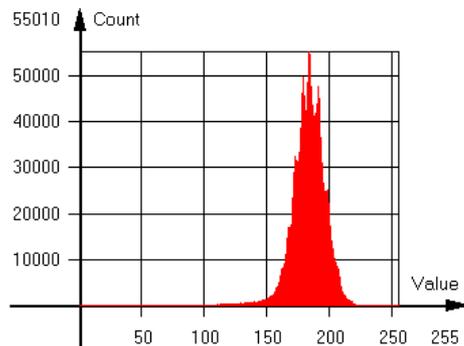
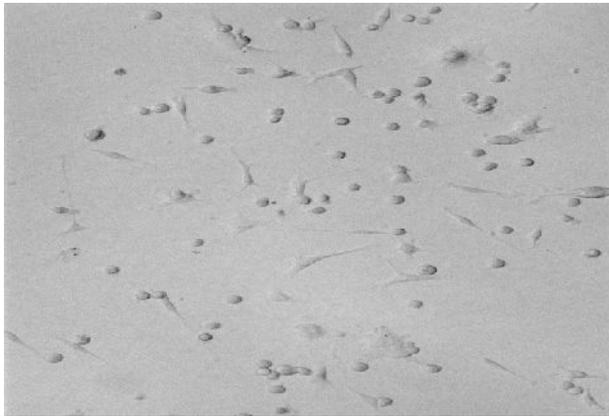
Plan de la présentation

- Position du problème
- Les images acquises
- ***Difficultés rencontrées***
- Détection et comptage des cellules
- Extraction des vignettes & Classification
- Conclusions & Suites du travail

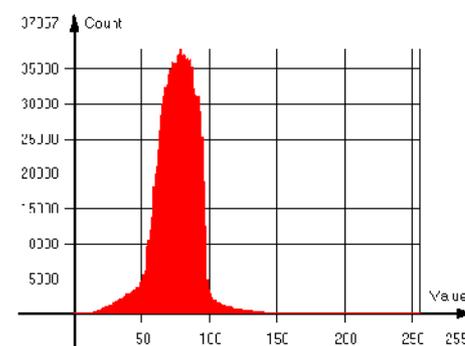
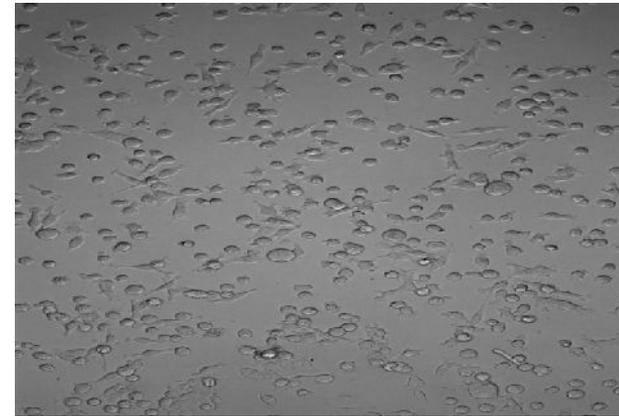
Difficultés rencontrées

Luminosité

- Rapport signal à bruit très faible
=> difficulté à différencier les cellules du fond
- Niveau de gris moyen différent d'une image à l'autre
=> impossibilité de proposer un seuil fixe



SNR = 18.56

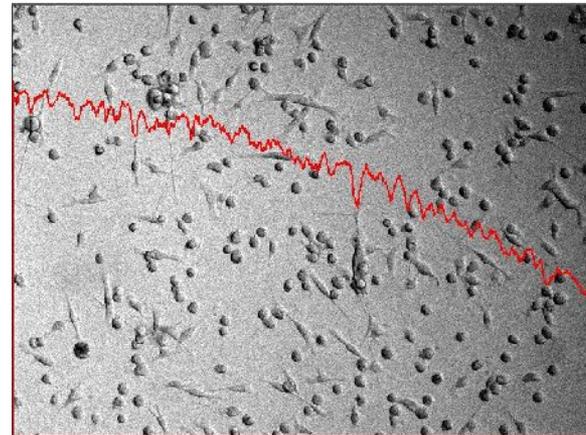
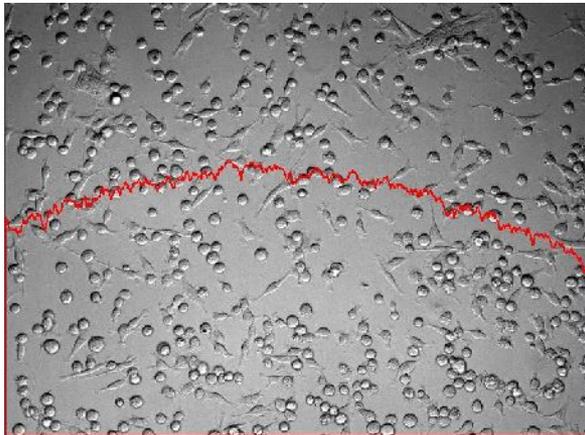


SNR = 9.83

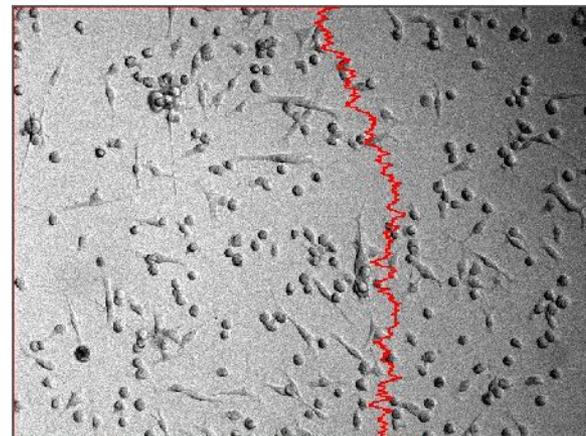
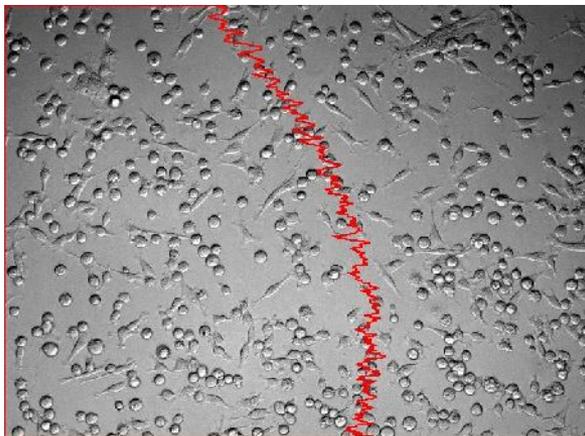
Difficultés rencontrées

Luminosité

- Gradient de lumière d'orientation variable (conditions d'acquisition)
=> **nécessité d'un seuillage adaptatif (et local?)**



*Projection des
niveaux de
gris le long
des colonnes*

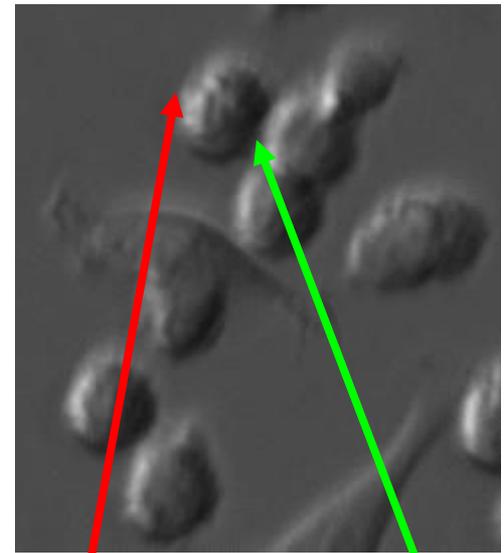


*Projection des
niveaux de
gris le long
des lignes*

Difficultés rencontrées

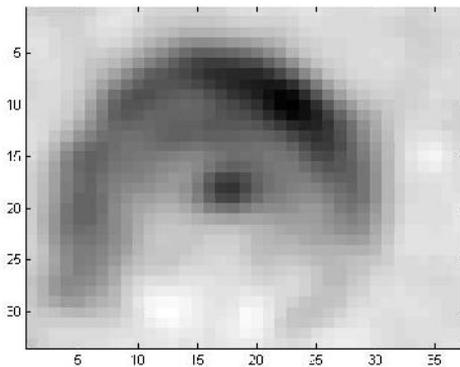
Éclairage directionnel

- Les cellules sont suréclairées d'un côté et sombres à l'opposé
=> la détermination du contour par un opérateur classique entraîne des contours disjoints

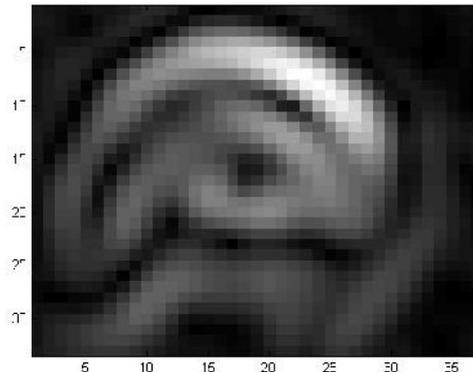


Côté clair

Côté
sombre



Une cellule vue sous
cet éclairage

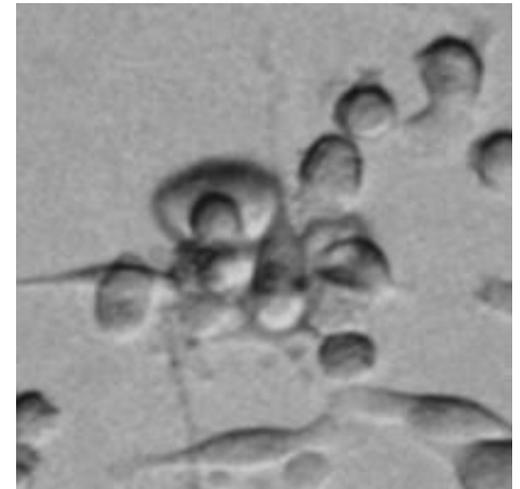
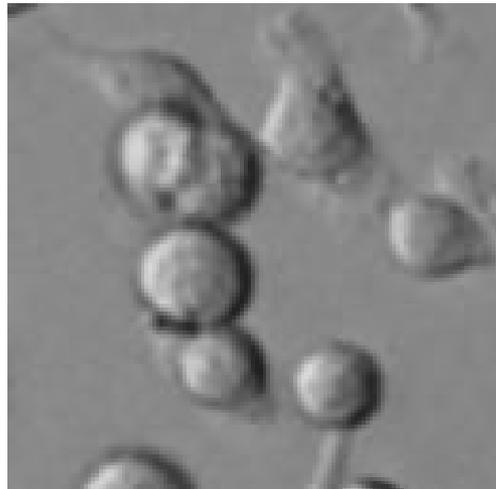
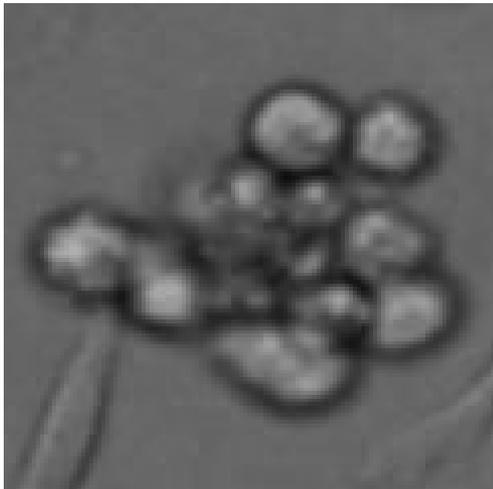


Le gradient obtenu

Difficultés rencontrées

Amas cellulaires

- Recouvrement des cellules dans les amas
=> difficulté pour compter ces cellules, localiser leurs contours et les segmenter (Quelle stratégie pour les amas?)



Difficultés rencontrées

Essais de traitements: MATLAB ou EasyAccess

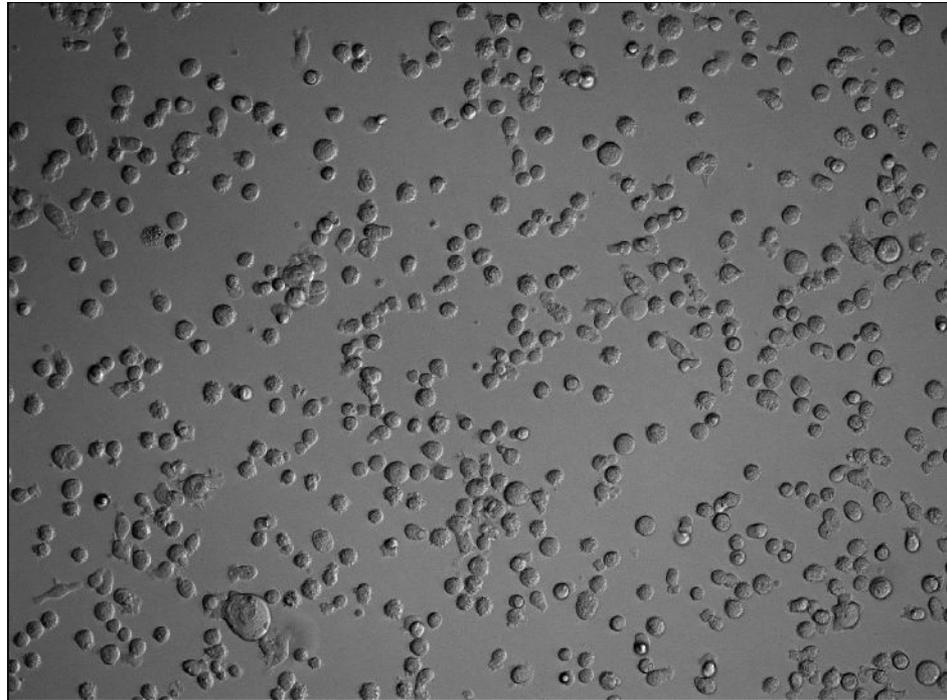


Image d'origine

Binarisation par OTSU
(Matlab)



Difficultés rencontrées

Essais de traitements: MATLAB ou EasyAccess

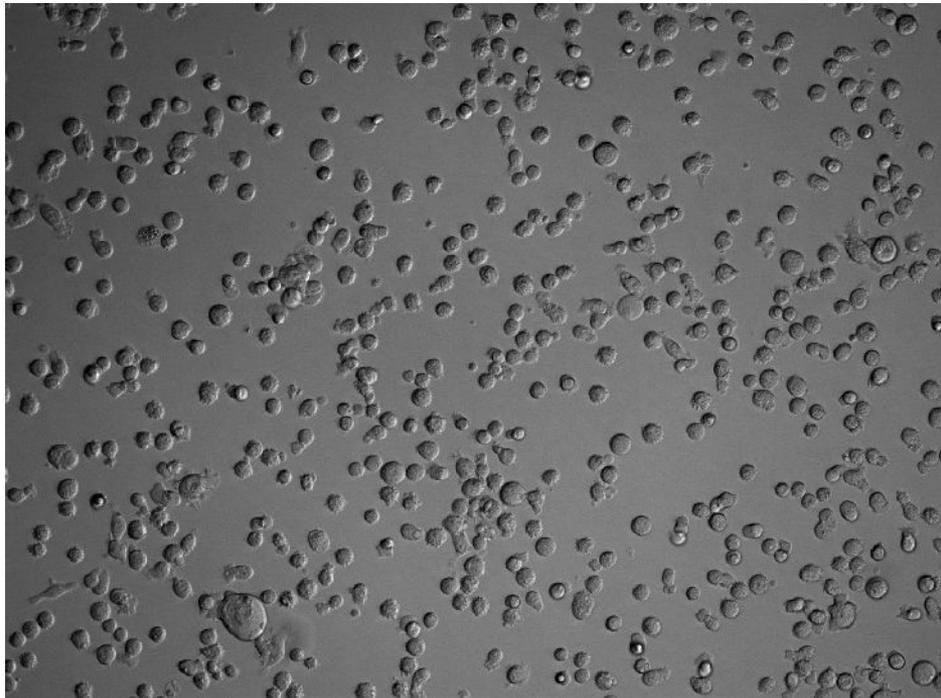
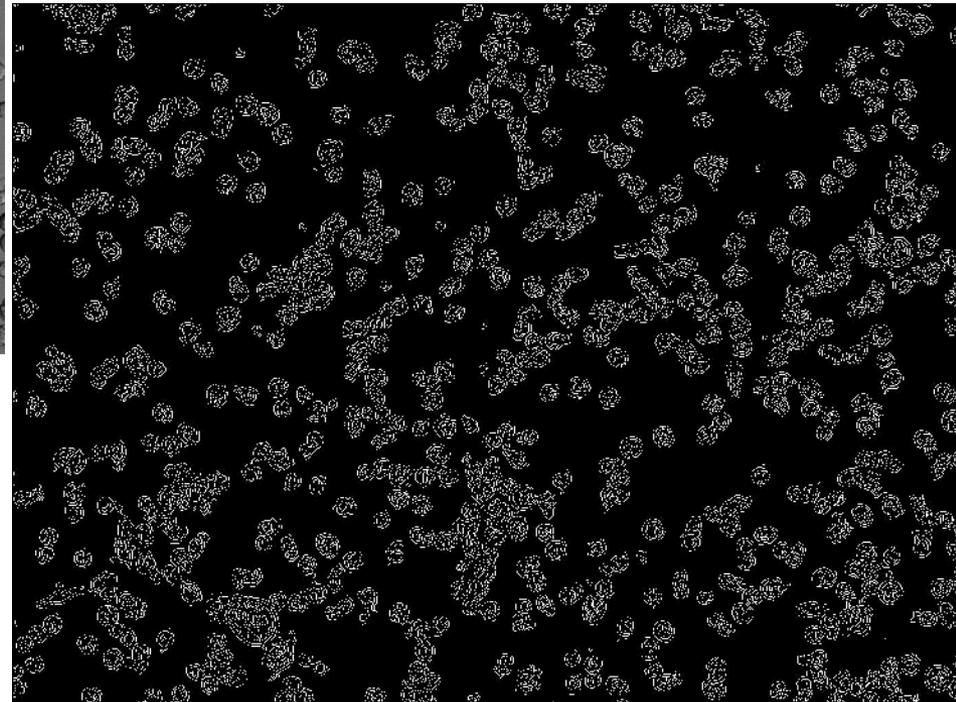


Image d'origine

Détection de contours
par opérateur de Canny
(Matlab)



Difficultés rencontrées

Essais de traitements: MATLAB ou EasyAccess

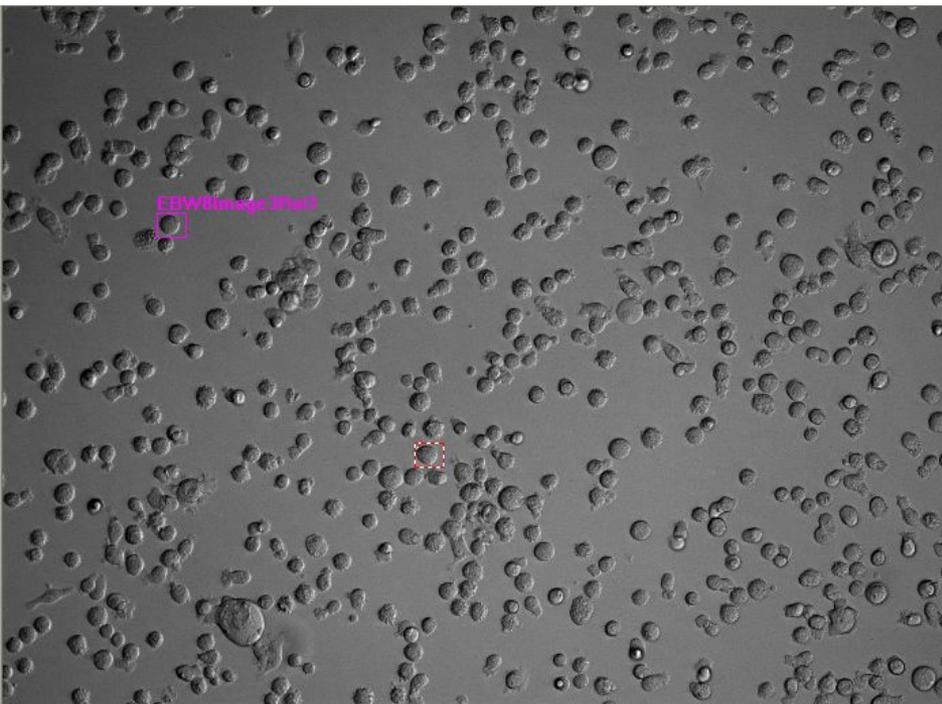
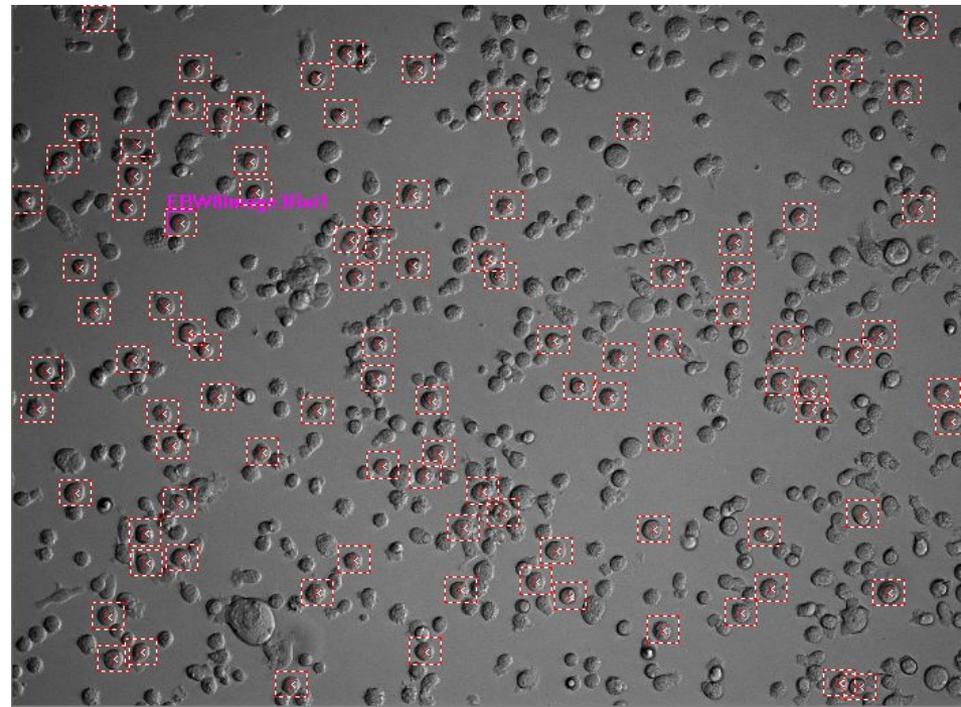


Image d'origine

Détection de formes
(EasyAccess)



Difficultés rencontrées

Essais de traitements: MATLAB ou EasyAccess

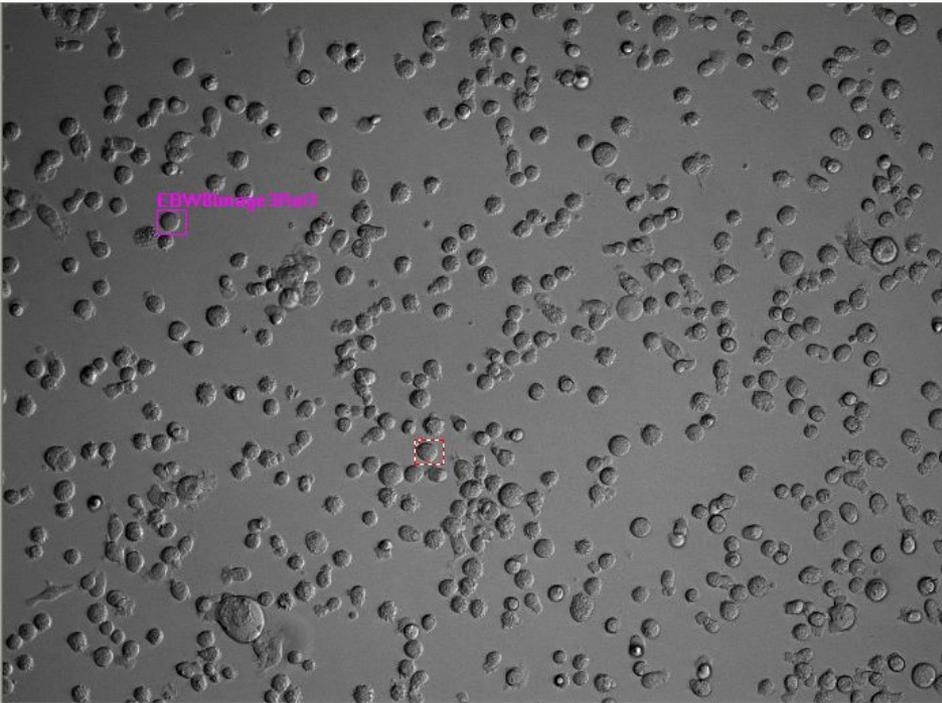
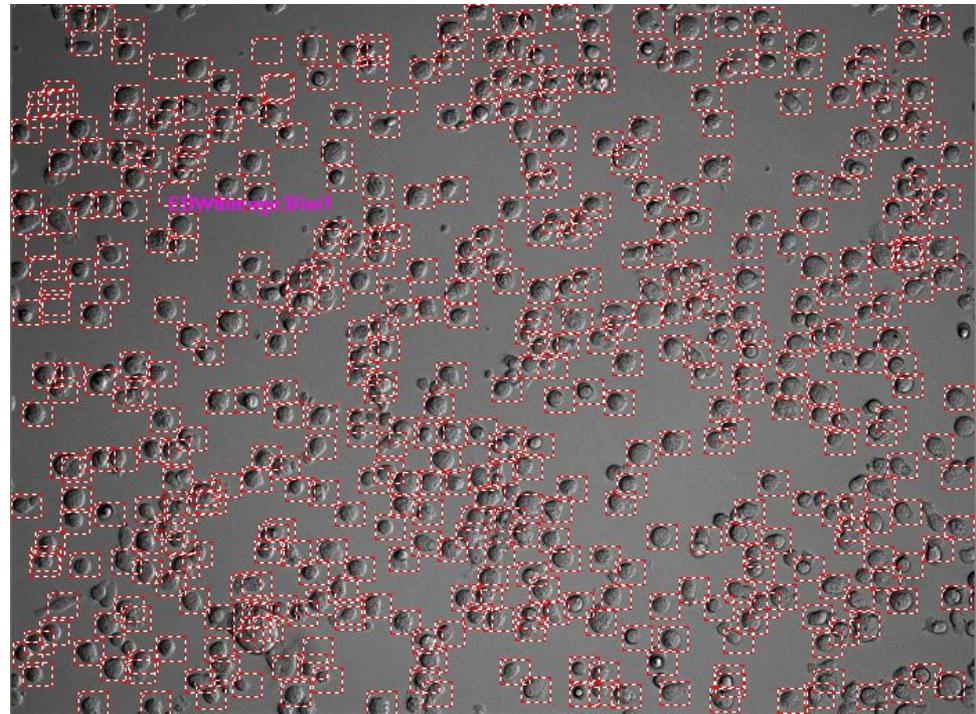


Image d'origine

Détection de formes
(EasyAccess)

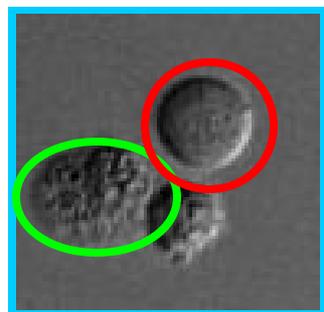
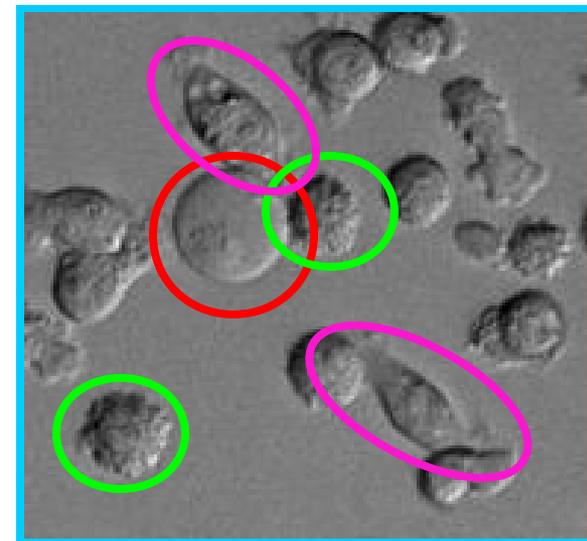
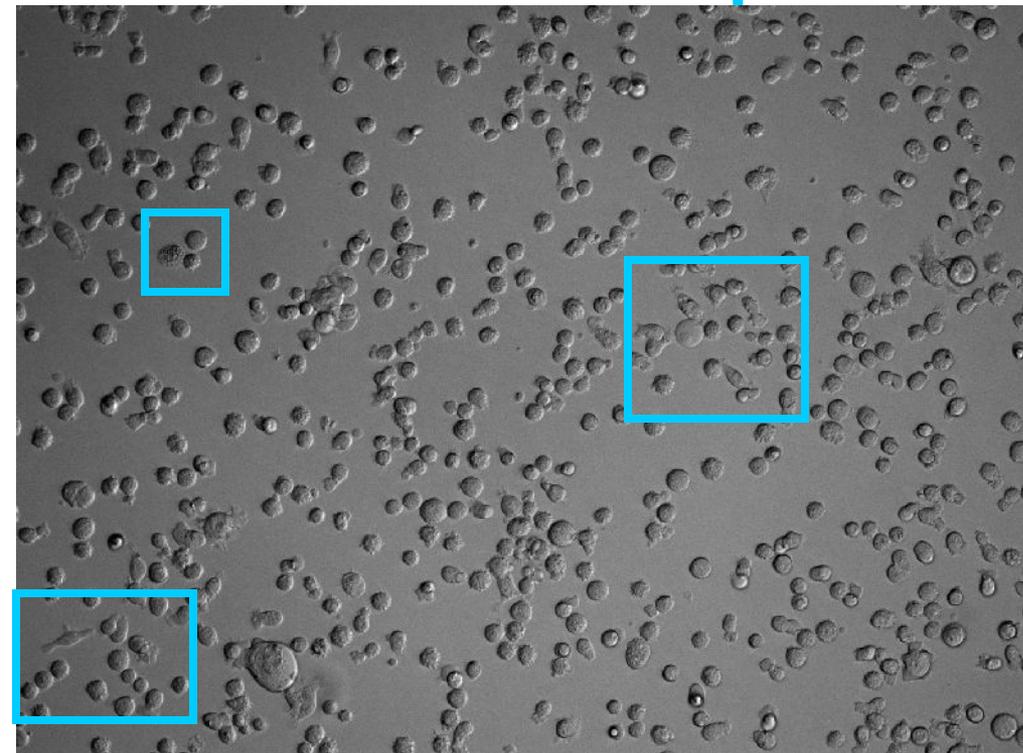


Plan de la présentation

- Position du problème
- Les images acquises
- Difficultés rencontrées
- ***Détection et comptage des cellules***
- Extraction des vignettes & Classification
- Conclusions & Suites du travail

Détection et comptage des cellules

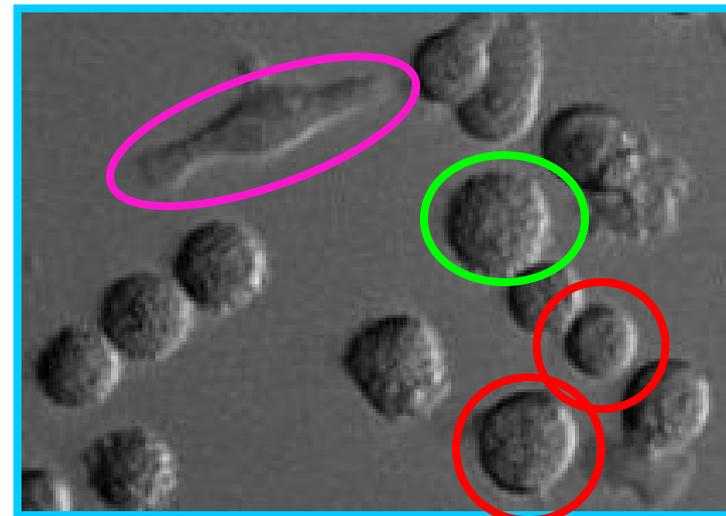
Les données de départ



Cellules lisses

Cellules blebbantes

Cellules allongées



Détection et comptage des cellules

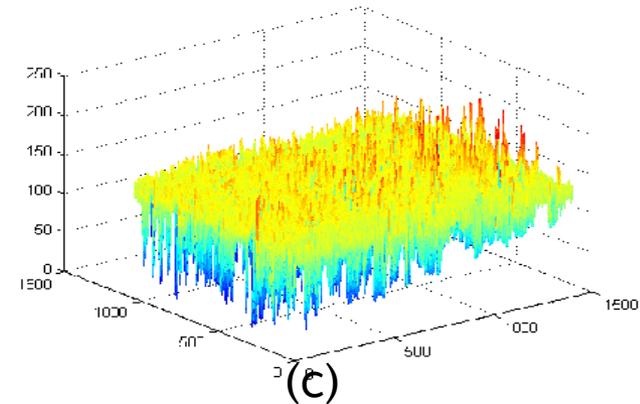
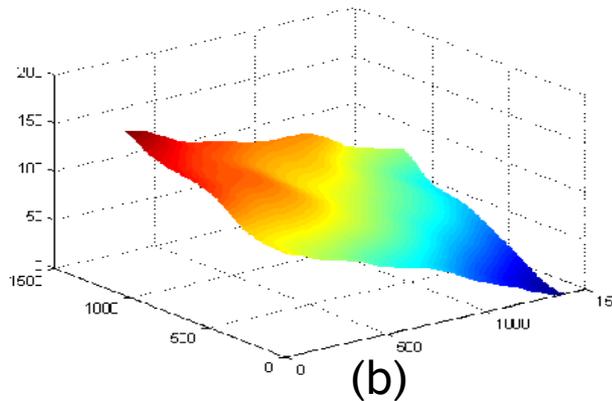
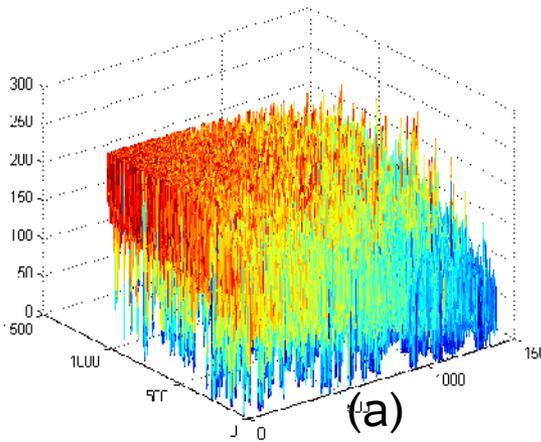
Les étapes du traitement

- **1) *Prétraitement* :**
Correction des problèmes de luminosité liés aux conditions d'acquisition → Gradient et SNR faible
- **2) *Recherche des centres des cellules* :**
Comparaisons de deux approches. Un filtre adapté aux images: le filtre « Halo » et la transformée de Hough.
- **3) *Comptage des cellules*:**
Recherche des maxima locaux

Détection et comptage des cellules

Prétraitement des images:

Correction du gradient de luminosité: 2 approches concurrentes 2D et 3D – Résultats proches



(a) Représentation en 3D des niveaux de gris de l'image d'origine,

(b) Modélisation de la surface, traduisant le niveau de gris moyen, qui est soustraite à l'image d'origine

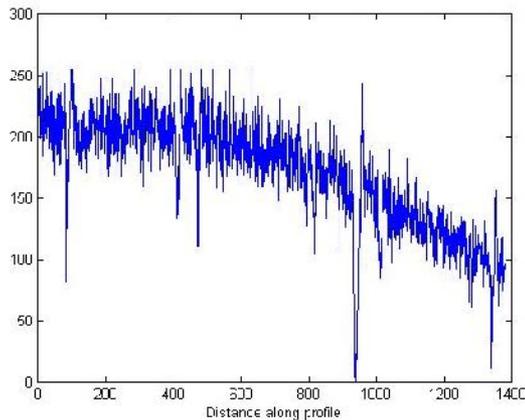
(c) Représentation en 3D des niveaux de gris de l'image corrigée

Détection et comptage des cellules

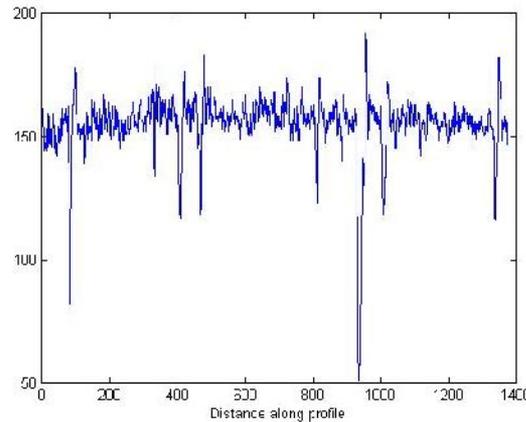
Prétraitement des images:

Correction du gradient de luminosité

Résultats



(a)



(b)

Profil des niveaux de gris:
(a) Avant et (b) après correction

Image
originale

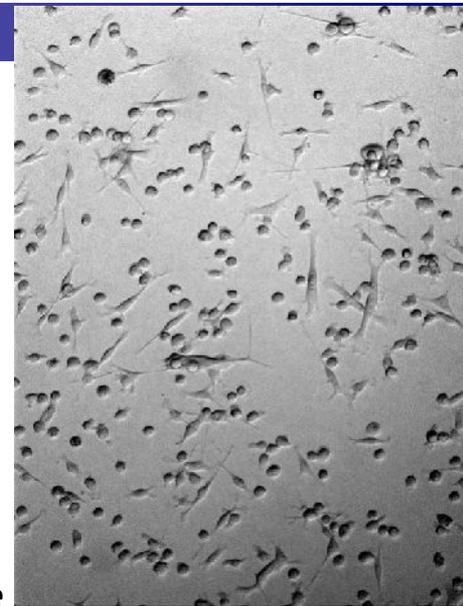
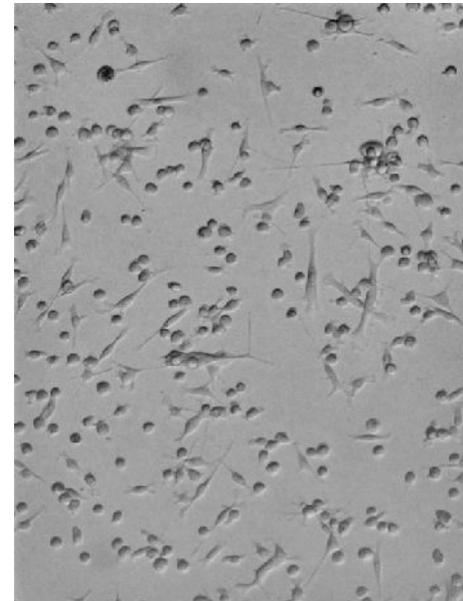


Image
corrigée



Détection et comptage des cellules

Prétraitement des images:

Accentuation des cellules par utilisation de l'image des écarts-type

- $STD - Image(i,j) = Image$ des écarts-type calculés dans un voisinage 3×3 autour du pixel.
- Uniformisation du fond de l'image.
- Mise en évidence des cellules par le renforcement de la texture.
- Processus de seuillage plus aisé.

Image corrigée

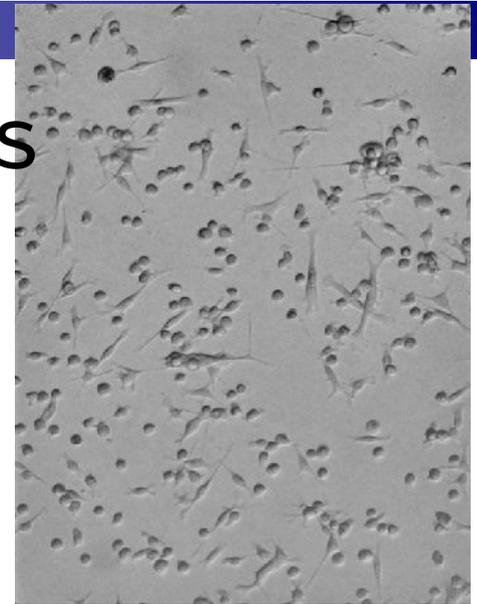
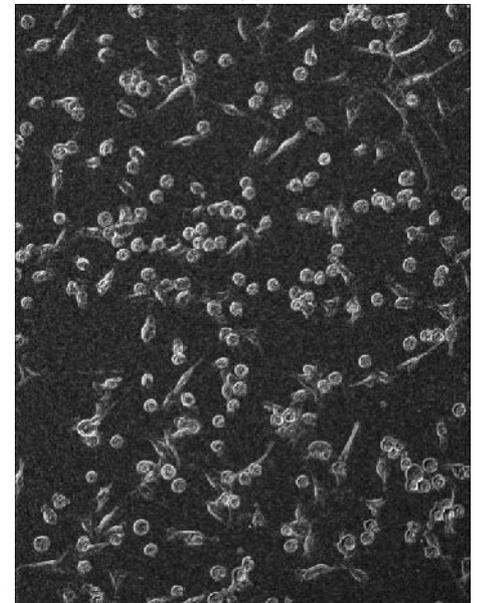
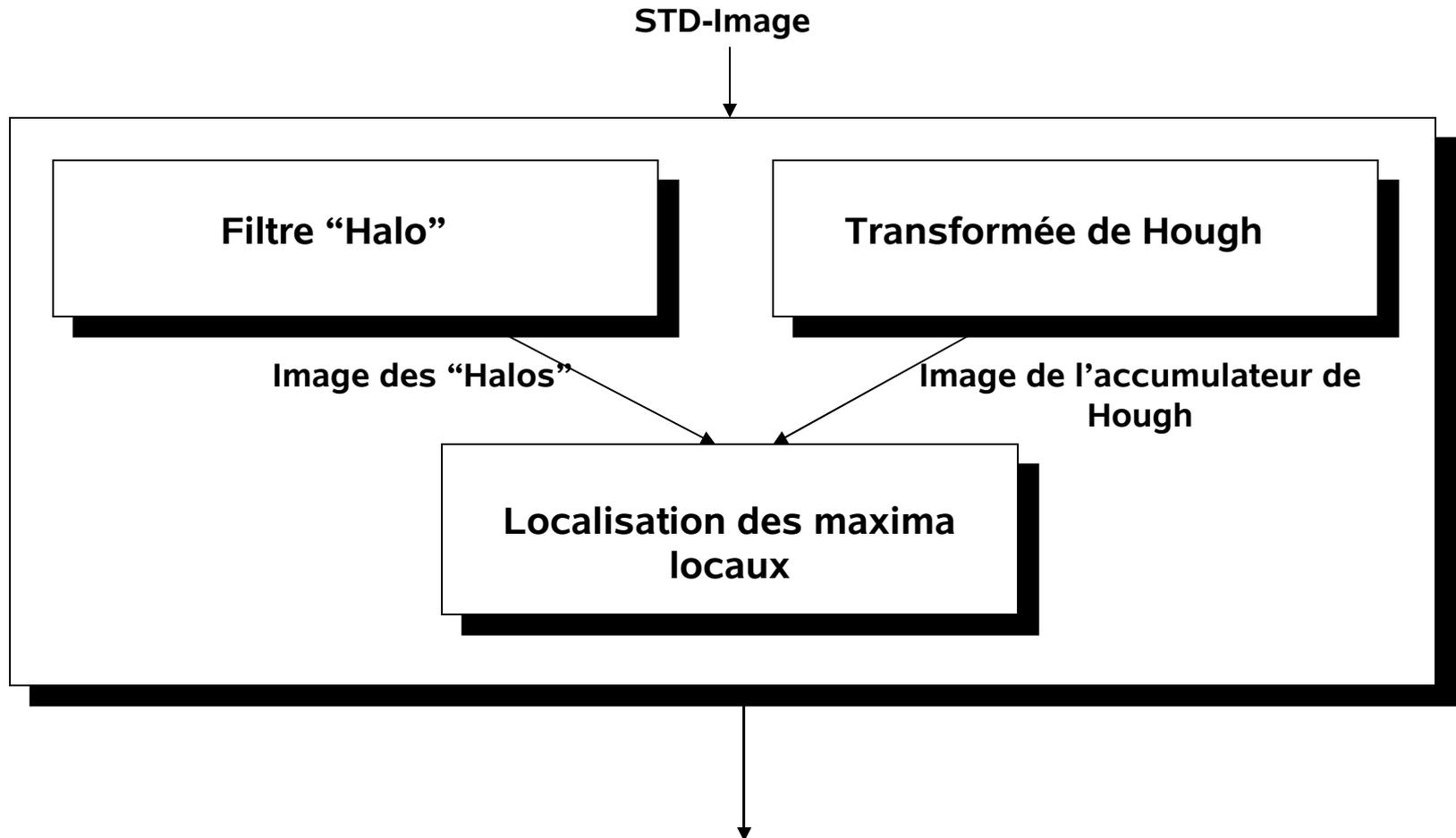


Image des écarts-type: STD_Image



Détection et comptage des cellules

Comparaison de deux méthodes

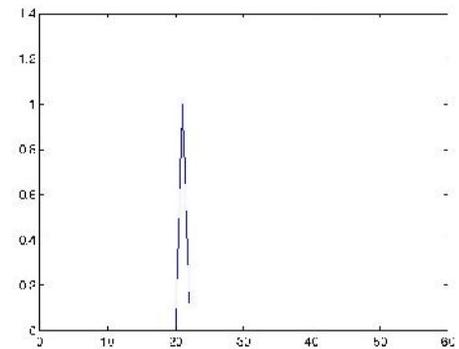
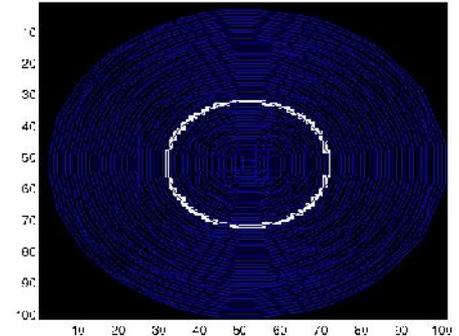
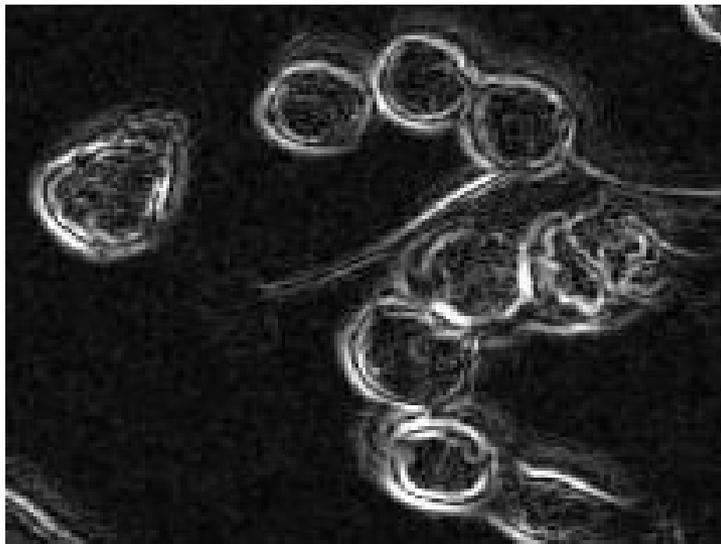


Nombre et coordonnées des maxima locaux pour chaque cellule

Détection et comptage des cellules

Idée

- L'image des écarts-type contient des anneaux don't l'intérieur est hétérogène/texturé
- Conception d'un filtre adapté à la forme recherchée



Le coefficient de corrélation entre un objet circulaire et des cercles concentriques de rayons variés montre un pic pour la valeur du rayon de l'objet

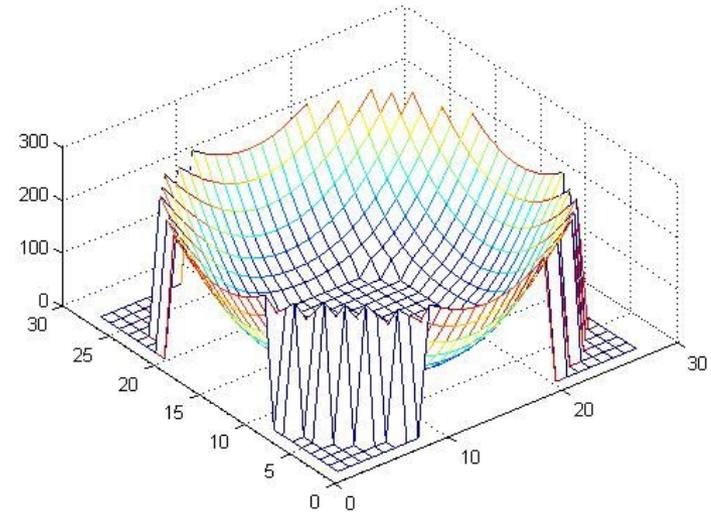
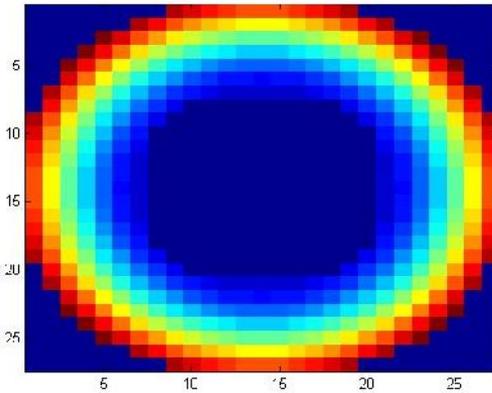
Détection et comptage des cellules

Le filtre “Halo”

- Problème: Les rayons des cellules sont inconnus
- Solution: Utiliser un masque de convolution (réponse impulsionnelle du filtre) formé de plusieurs cercles concentriques dont les rayons varient dans un intervalle connu, avec une pondération des différents cercles
 - *Applicable aux cellules rondes et allongées*
 - *Favorise la contribution des pixels périphériques de l’anneau*
 - *Nécessite une connaissance a priori sur les valeurs des rayons des cellules*
- Les coefficients du filtre sont obtenus à partir de la différence de deux gaussiennes inversées

Détection et comptage des cellules

Le filtre “Halo”



- L'équation du filtre halo est donnée ci-dessous.

$$f(x, y) = -255 \times \left[e^{-\frac{(x-\mu_{1x})^2 + (y-\mu_{1y})^2}{2\sigma_1}} - e^{-\frac{(x-\mu_{2x})^2 + (y-\mu_{2y})^2}{2\sigma_2}} \right]$$

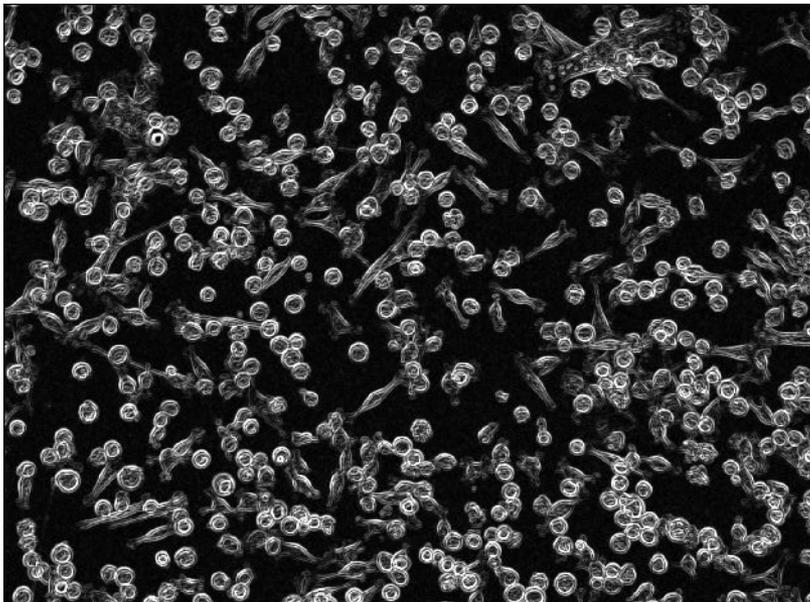
où:

$$\sigma_1 \approx 2 \times \sigma_2$$

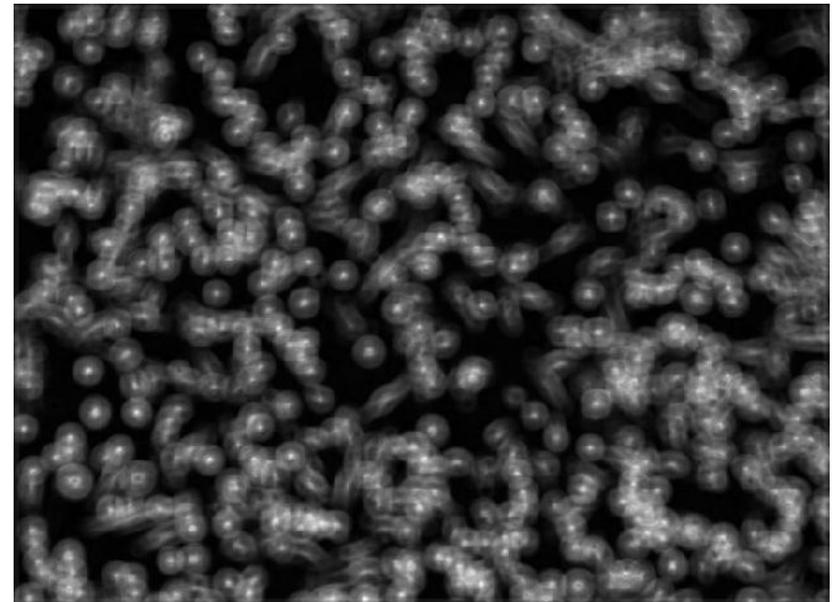
Détection et comptage des cellules

Le filtre «Halo»

- La convolution entre la réponse impulsionnelle du filtre et l'image des écarts-type conduit à une image présentant des halos avec un zone très lumineuse située au centre des cellules



STD-Image

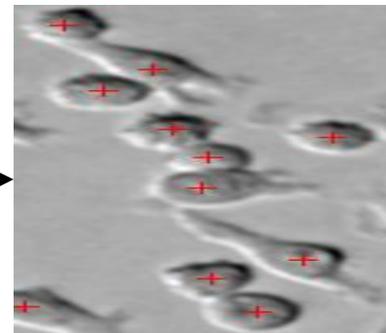
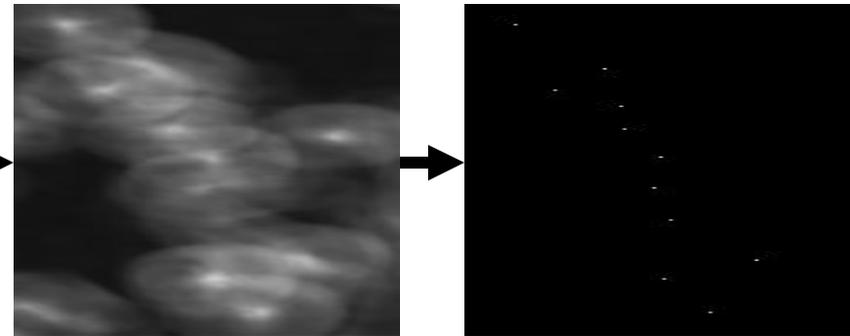
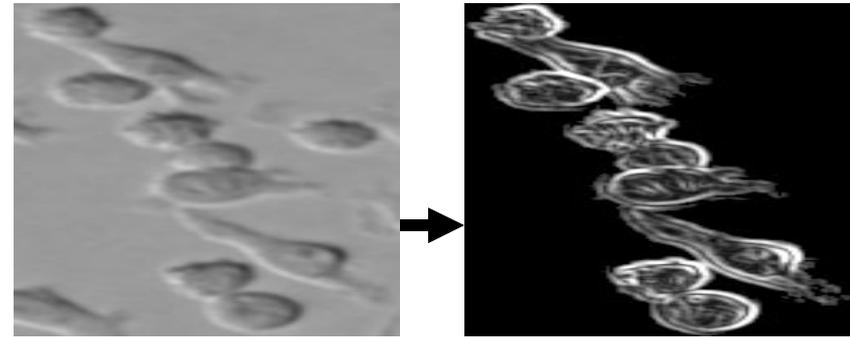
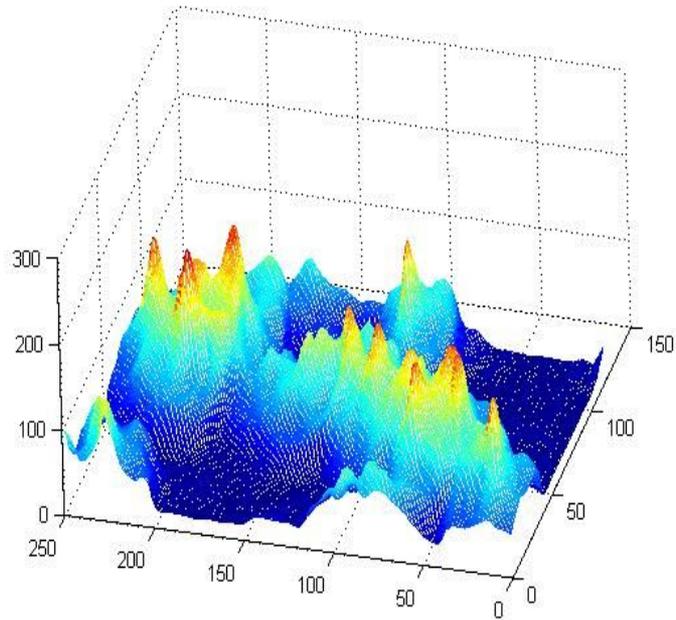


STD-Image filtrée par le filtre « Halo »
(Paramètre du rayon = 15 pixels)

Détection et comptage des cellules

Extraction des maxima locaux

- Maximum local = centre d'une cellule

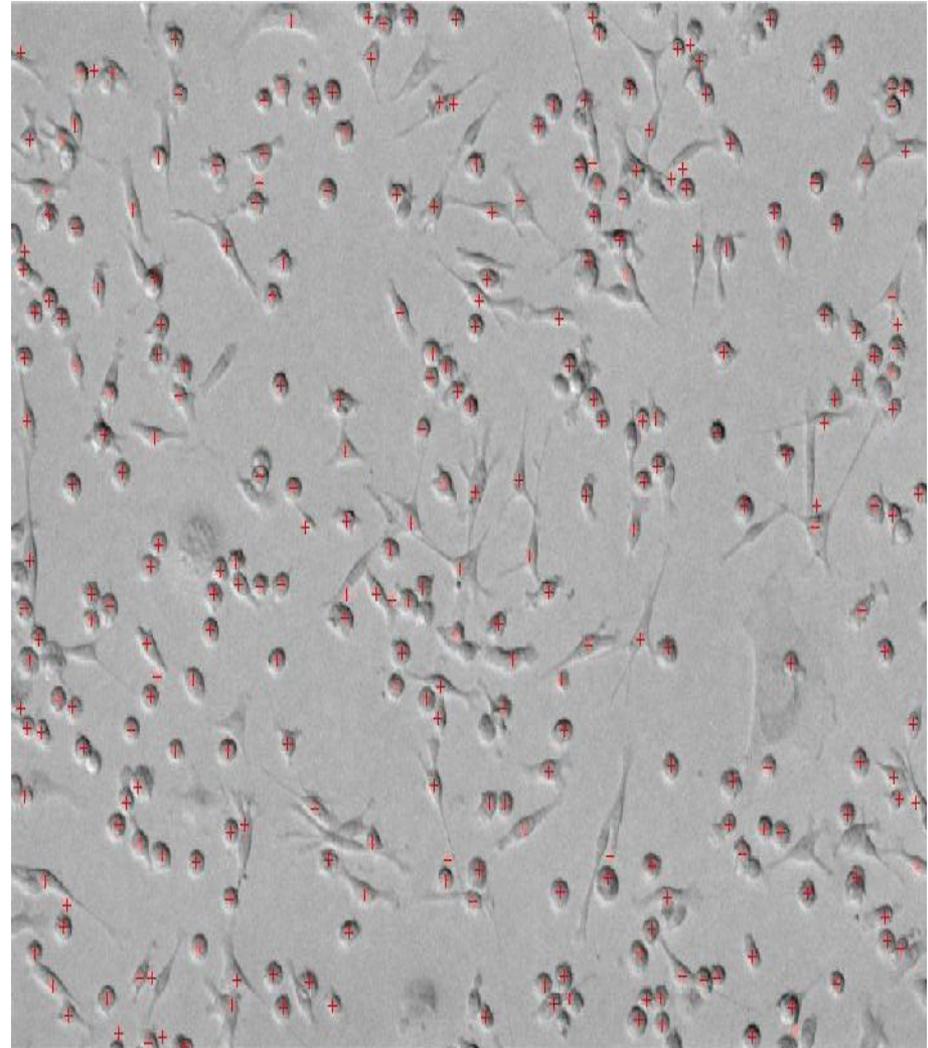
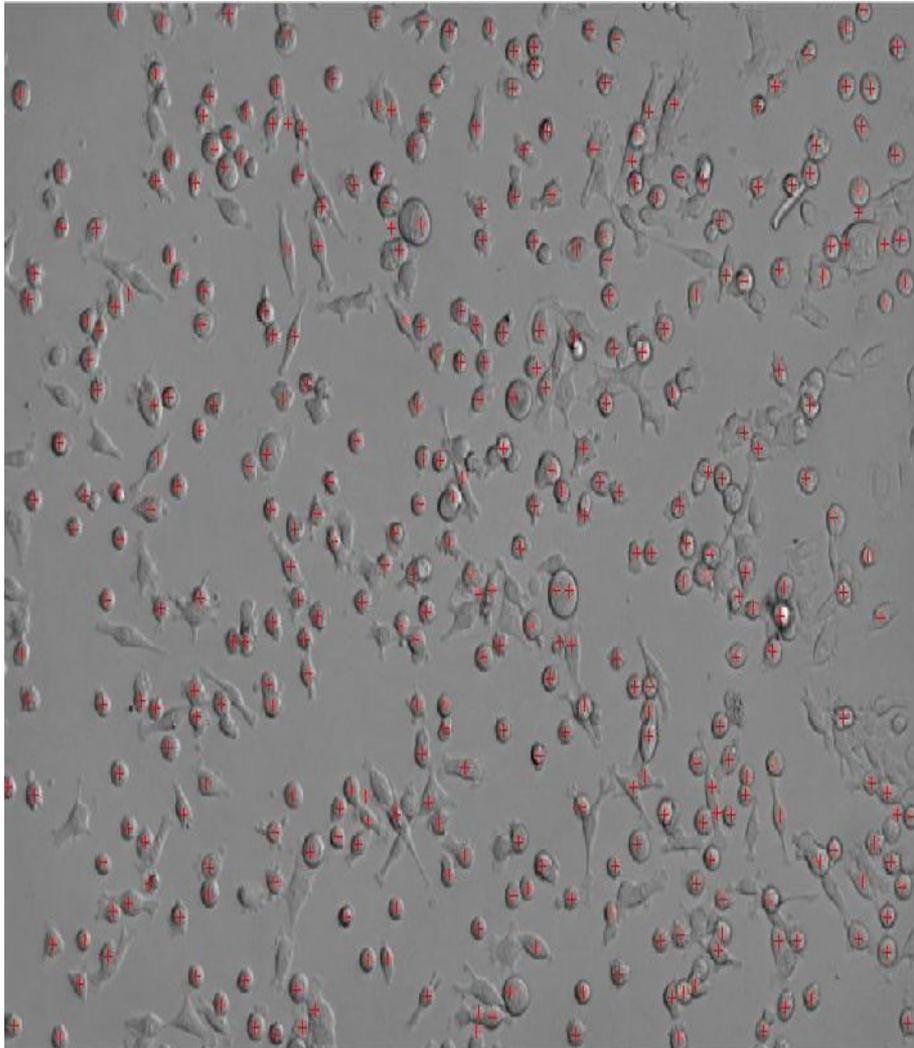


btention

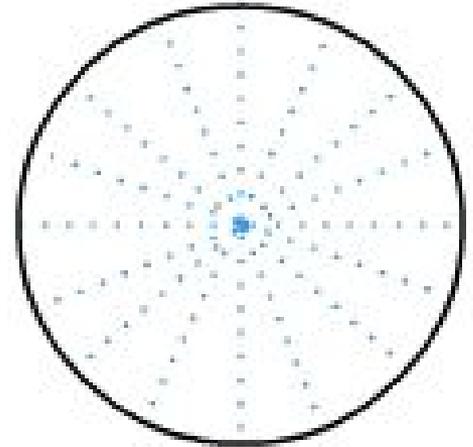
*Zoom sur la chaîne
des traitements
appliqués à une
zone d'une image*

Détection et comptage des cellules

Exemples de résultats



Détection et comptage des cellules



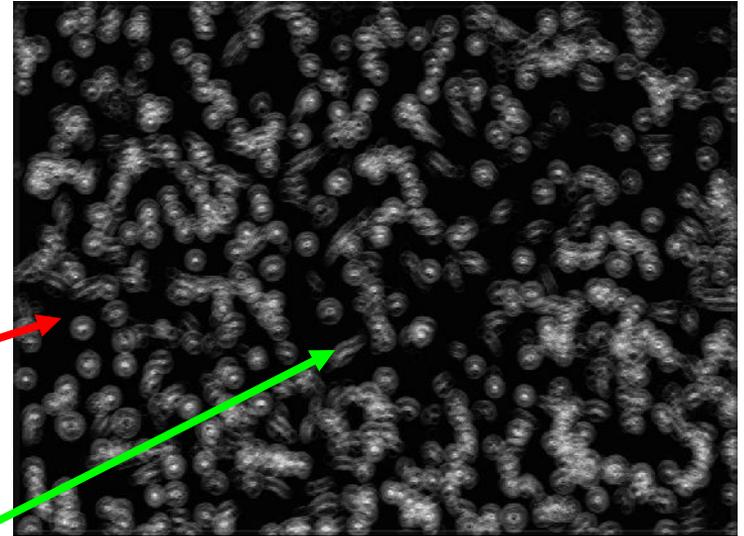
Convergence des droites vers le centre



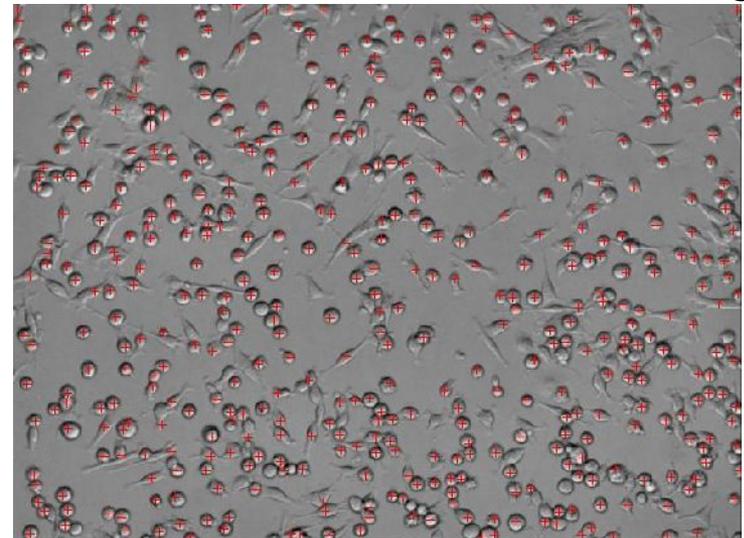
Accumulateur de votes

Détection et comptage des cellules

- Implémentation de l'algorithme de PINZON² sur l'image des écarts-type, binarisée en utilisant la méthode ISODATA pour le calcul du seuil.
- L'accumulateur de Hough présente des pics (**cellules rondes**) et des lignes de crêtes (**cellules allongées et amas cellulaires non circulaires**).
- Les maxima locaux, associés aux centres des cellules, sont extraits de la même manière que celle décrite précédemment pour l'image des « halos ».



Visualisation de l'accumulateur de Hough



Localisation des centres des cellules

Détection et comptage des cellules

Précision de la détection

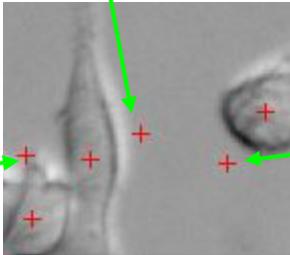
- 3 voies de comparaisons: décomptage manuel par des experts, filtre « Halo », transformée de Hough
- Le comptage manuel peut inclure des cellules des bords ou des cellules internes aux amas.

	Human expert	"Halo" filtering	Hough transform
Number of cells detected	66901	57478	62898
% of cells detected		85,92%	94,02%

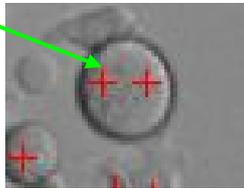
Détection et comptage des cellules

Analyse des erreurs de détection

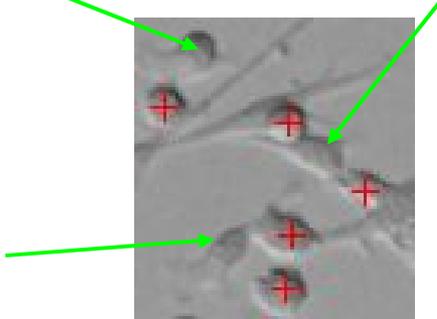
Détection erronées dans le fond



Détections multiples d'une cellule unique



Cellules non détectées



Analyse des résultats à l'issue du filtre "Halo"

	Total number	Detected in background	Multiple detected	Missed
Number	5134	0	44	1594
%		0	0,86%	31,05%
Mean		0	3,14	113,86
Standard Deviation		0	1,04	33,48

Analyse des résultats après la transformée de Hough

	Total number	Detected in background	Multiple detected	Missed
Number	5642	74	212	1328
%		1,31%	3,76%	23,54%
Mean		5,286	15,143	94,857
Standard Deviation		1,7	4,752	23,86

Détection et comptage des cellules

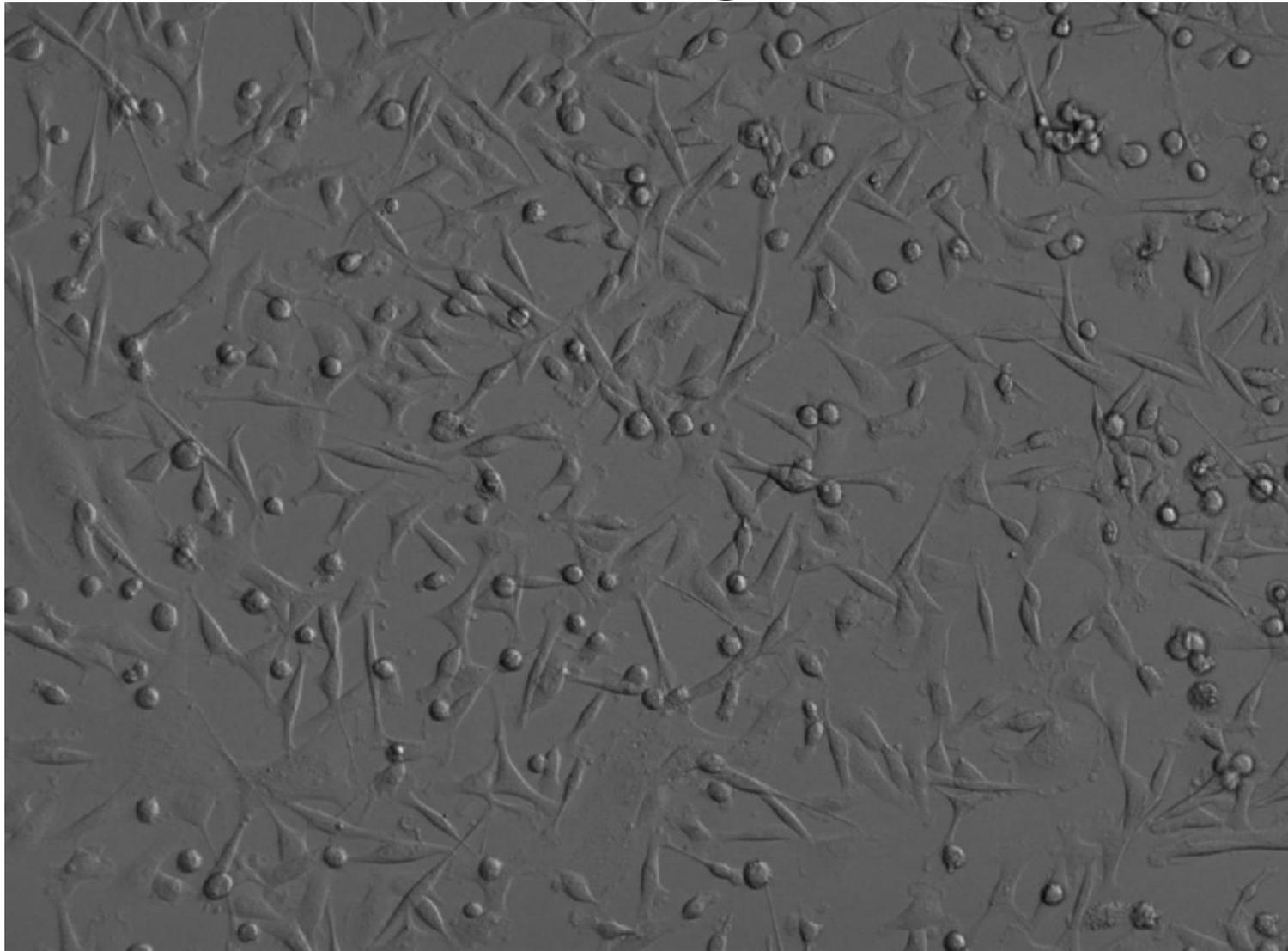


Image d'origine

Détection et comptage des cellules

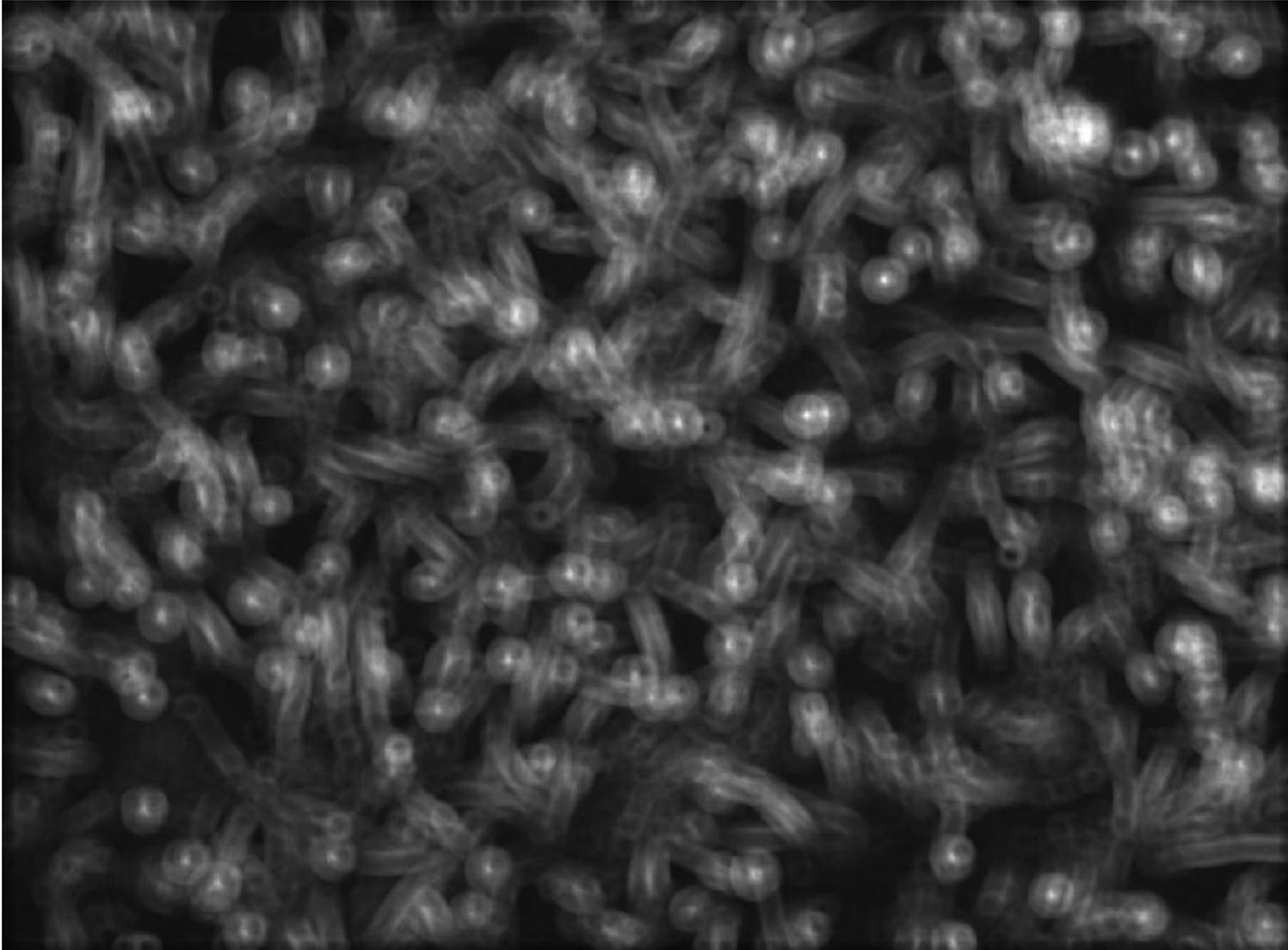
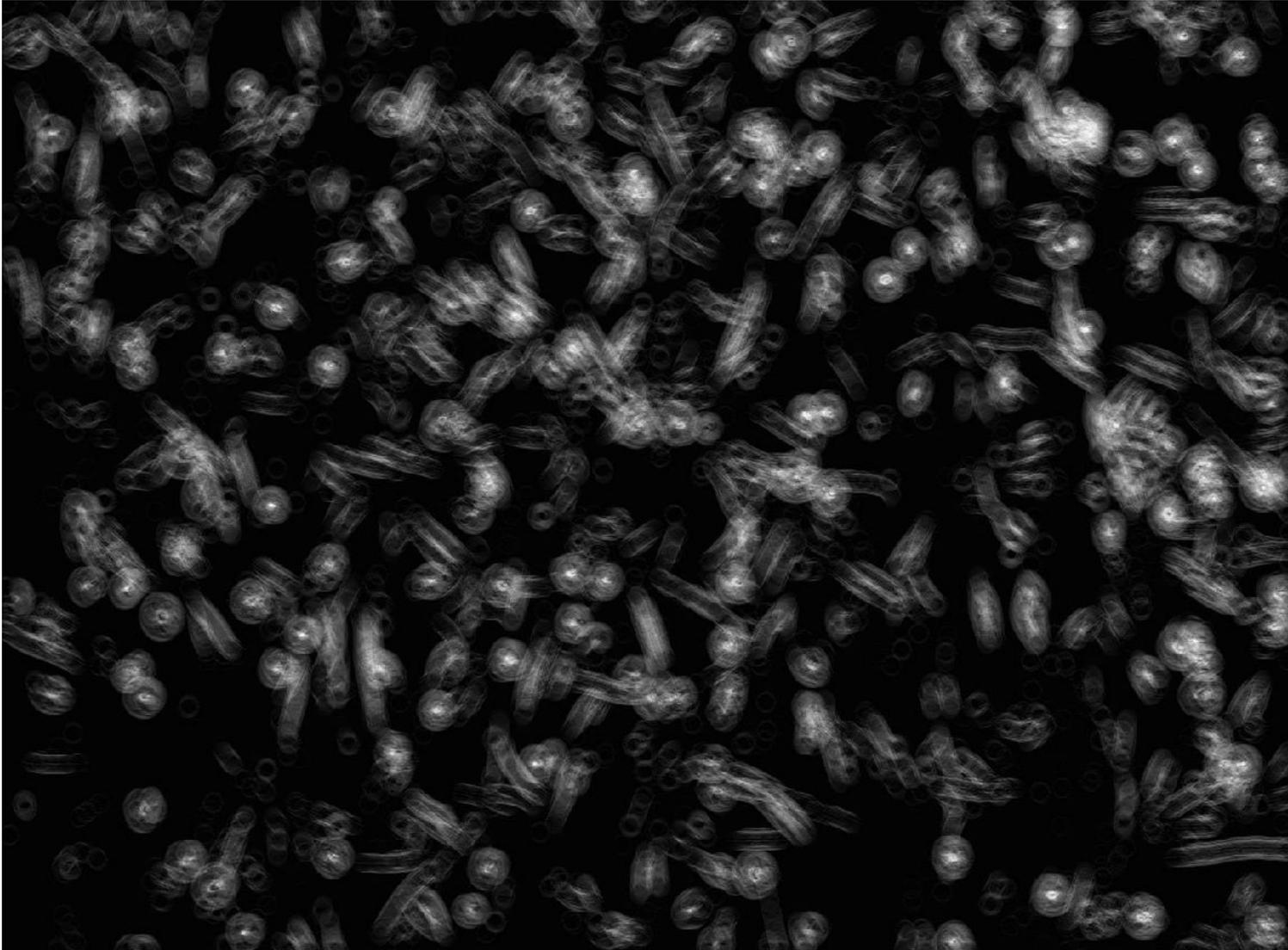


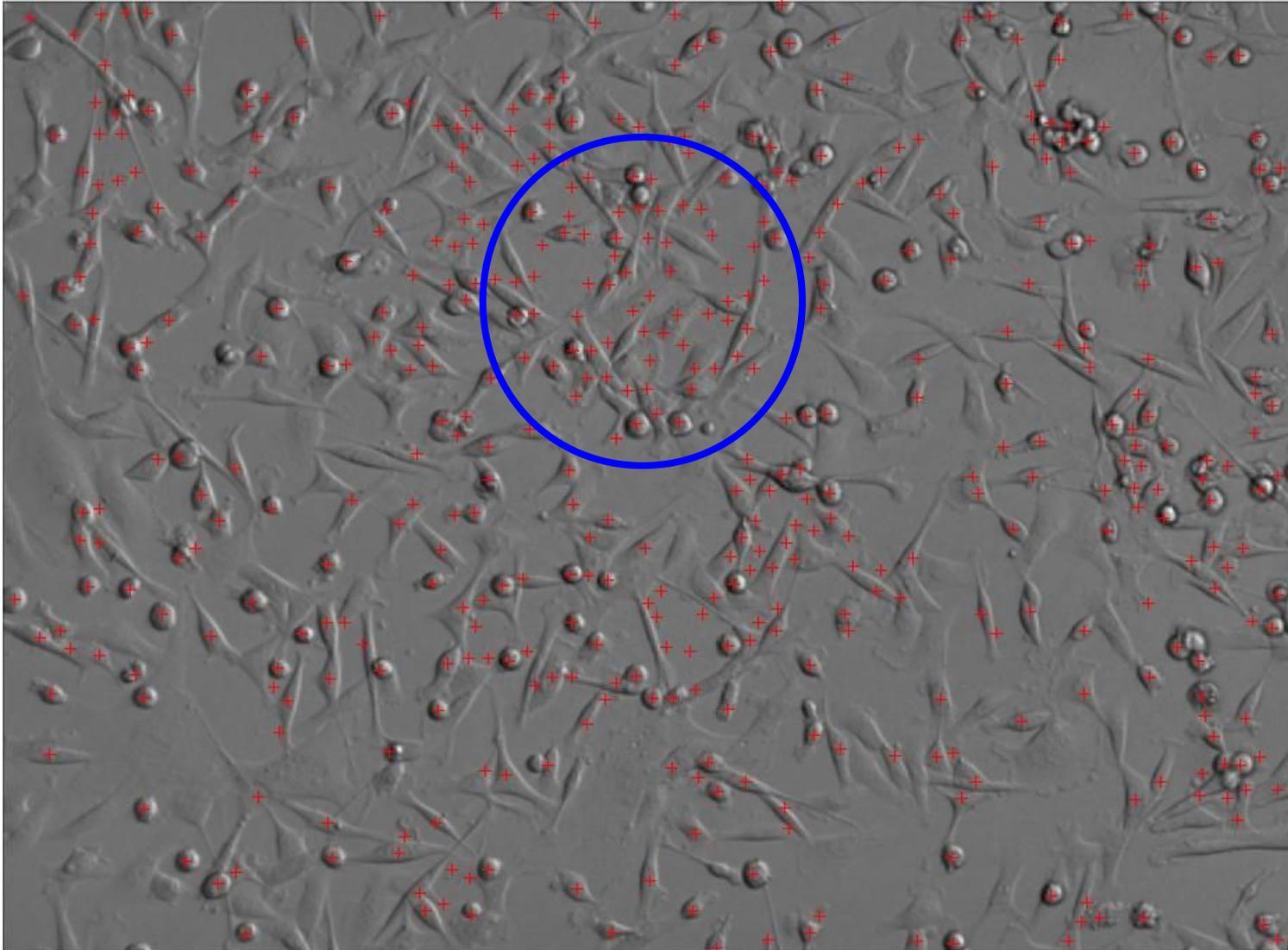
Image des « Halos »

Détection et comptage des cellules



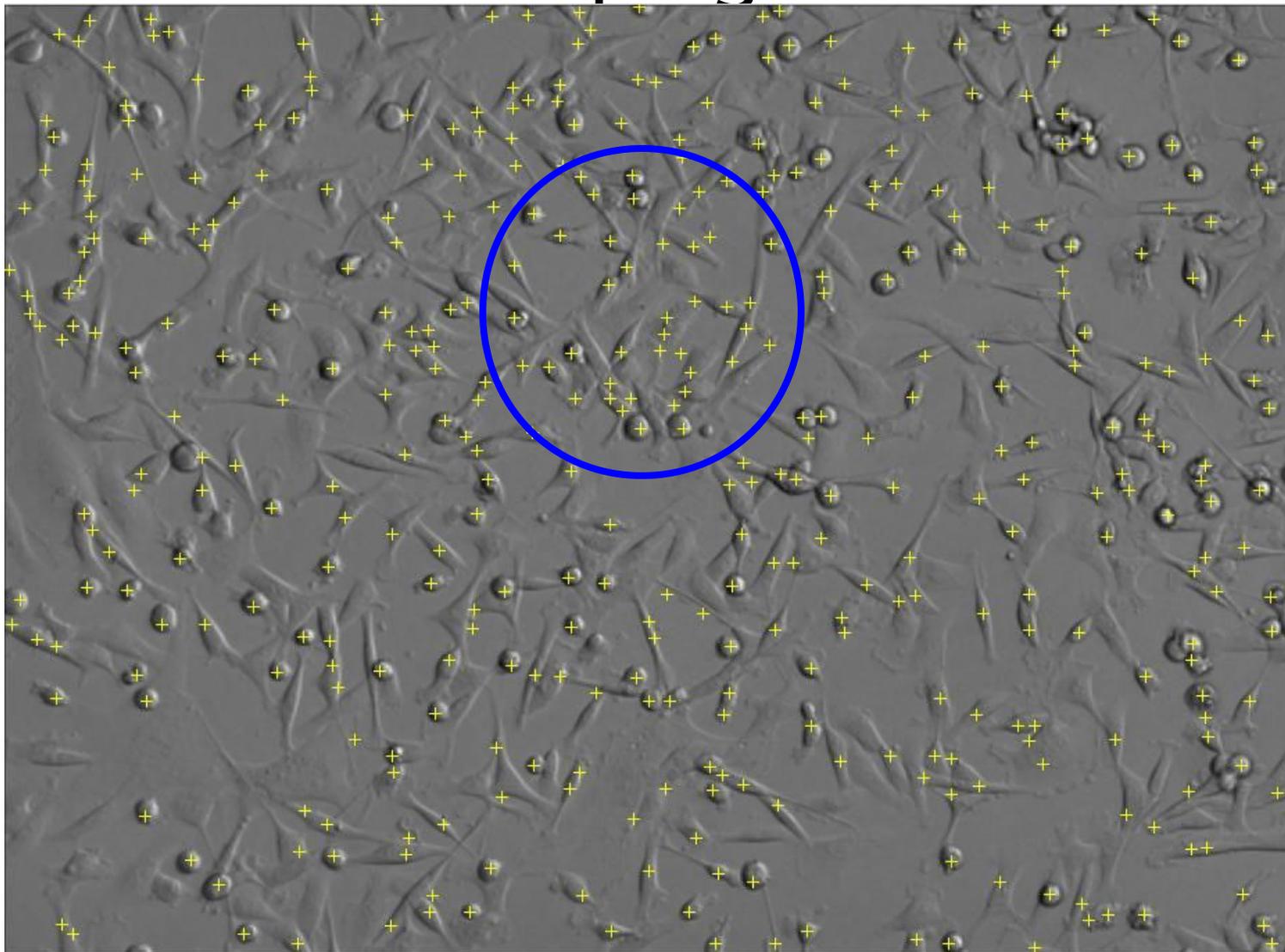
Accumulateur de Hough

Détection et comptage des cellules



Centres des cellules trouvés à partir des « Halos »

Détection et comptage des cellules



Centres des cellules trouvés à partir de « Hough »

Détection et comptage des cellules

Conclusion

- La transformée de Hough trouve plus de cellules que le filtre « Halo », en particulier pour ce qui est des cellules allongées.
- La transformée de Hough conduit à plus d'erreurs en terme de détection dans le fond ou de multiples détections
- **Idée:** Utiliser la complémentarité des deux approches pour augmenter le nombre de cellules détectées en limitant les erreurs. **Problème:** Comment?

Plan de la présentation

- Position du problème
- Les images acquises
- Difficultés rencontrées
- Détection et comptage des cellules
- ***Extraction des vignettes & Classification***
- Conclusions & Suites du travail

Extraction des vignettes & Classification

Les étapes du traitement

- **1) Extraction des composantes connexes :**
Binarisation de l'image des écarts-type en utilisant l'algorithme d'OTSU
- **2) Segmentation des cellules :** Algorithme de la « Ligne de Partage des Eaux – LPE » avec pour germes les centres des cellules et raffinement par utilisation des contours actifs.
- **3) Classification:**
5 paramètres morphologiques et méthode des K-means



Extraction des vignettes & Classification

Extraction des vignettes & Classification

Extraction des composantes connexes par l'Algorithme d'Otsu

Soit la variance pondérée *intra-classe* :

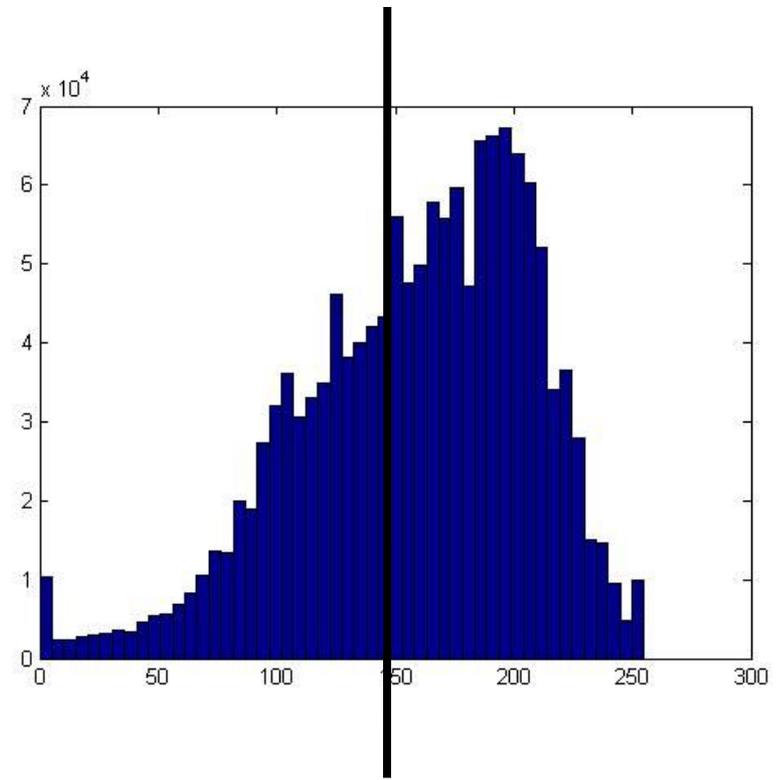
$$\sigma_w^2(t) = q_1(t) \sigma_1^2(t) + q_2(t) \sigma_2^2(t)$$

où les probabilités de chaque classe sont données par :

$$q_1(t) = \sum_{i=1}^t P(i) \quad q_2(t) = \sum_{i=t+1}^I P(i)$$

et les moyennes:

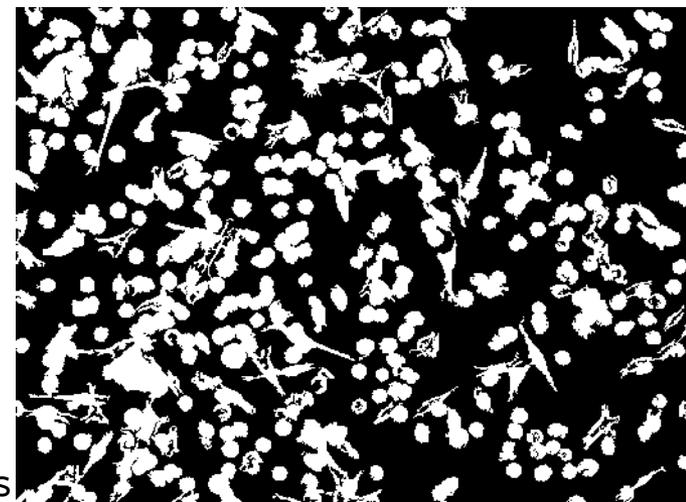
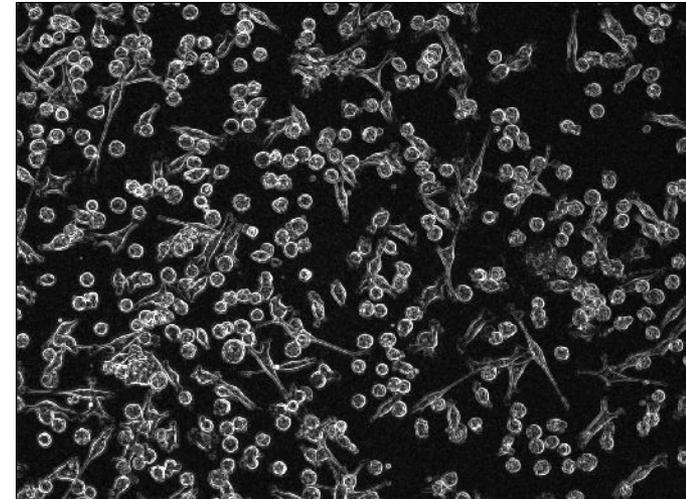
$$\mu_1(t) = \frac{\sum_{i=1}^t iP(i)}{q_1(t)} \quad \mu_2(t) = \frac{\sum_{i=t+1}^I iP(i)}{q_2(t)}$$



Extraction des vignettes & Classification

Extraction des composantes connexes par l'Algorithme d'Otsu

- Objectif : séparer les cellules du fond
- Binarisation par hystérésis avec un seuil calculé par la méthode d'Otsu
- Permet de supprimer les débris et éliminer rejeter les centres erronés des cellules (centres appartenant au fond)
- Résultat : composantes connexes de l'image



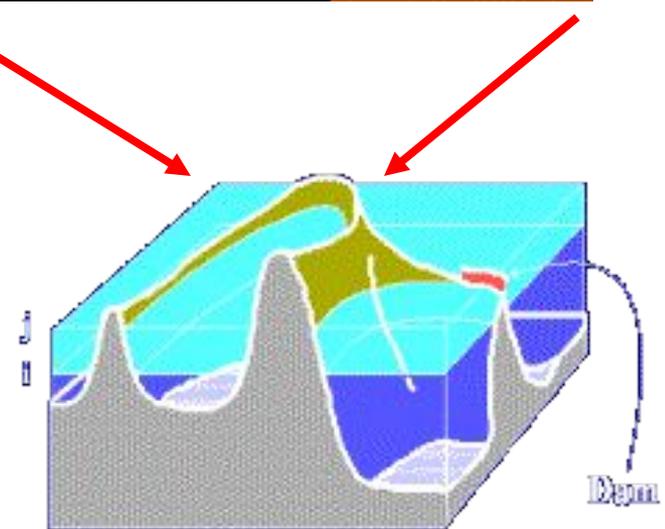
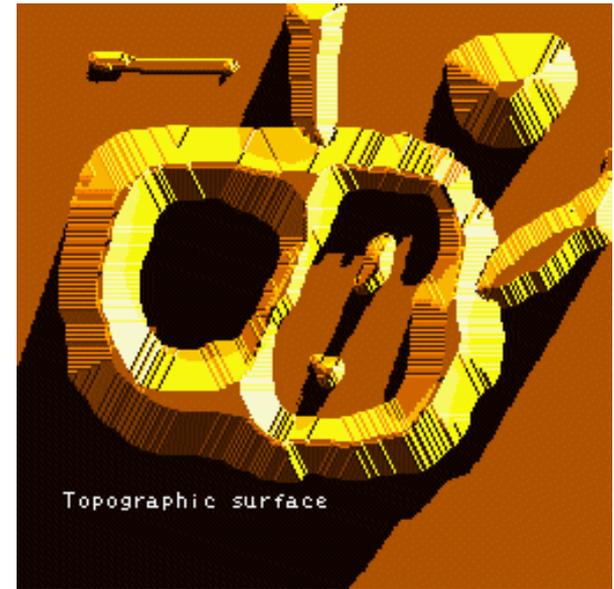
Passage de l'image des écarts-type à l'image binaire des composantes connexes



Exemple d'une composante connexe correspondant à un amas cellulaire

Extraction des vignettes & Classification

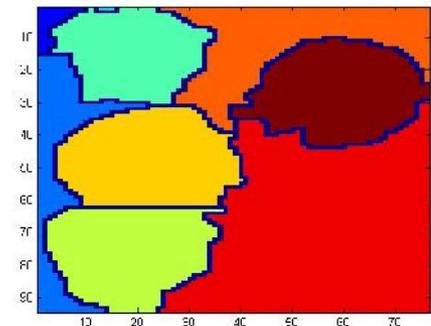
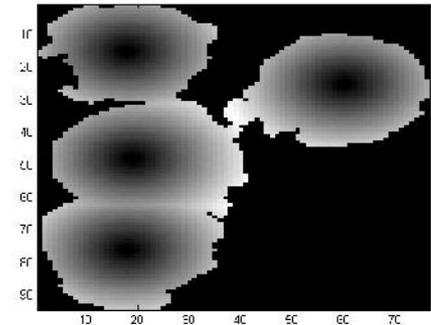
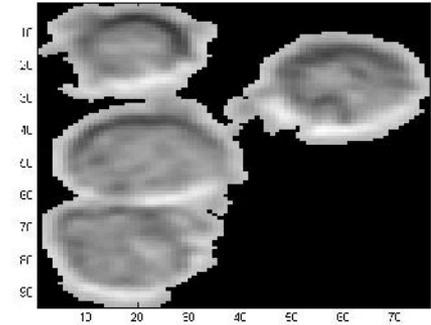
- Un image en niveaux de gris est considérée une surface topographique.
- L'inondation débute à partir de « marqueurs» ou de minima locaux.
- L'inondation fait remplir les bassins à différents niveaux.
- Si 2 bassins se fondent, un barrage est construit jusqu'à la hauteur du maximum global: ce barrage est une LPE.
- Avantage : on obtient un contour fermé, indépendant de la taille et de la forme des objets

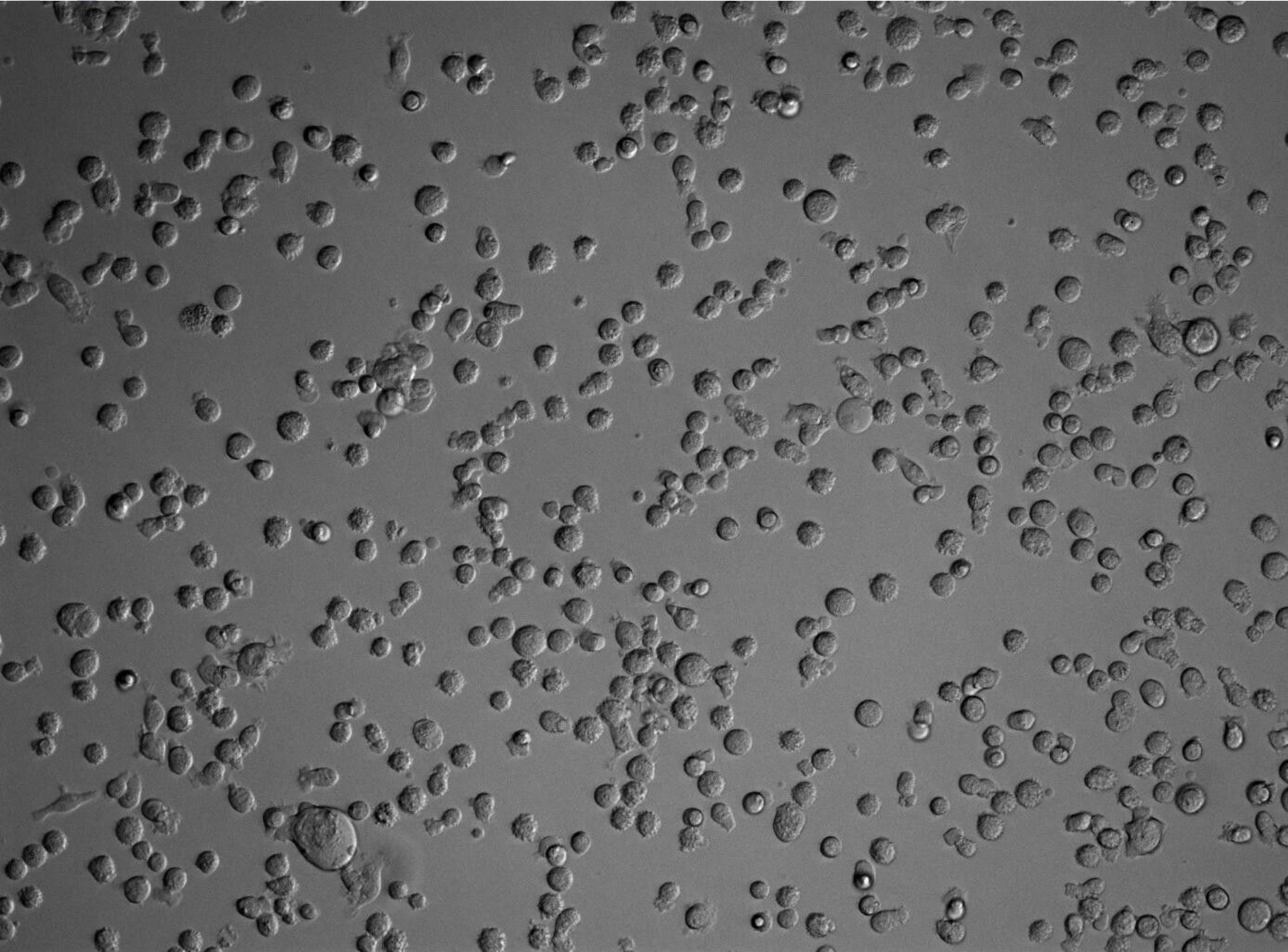


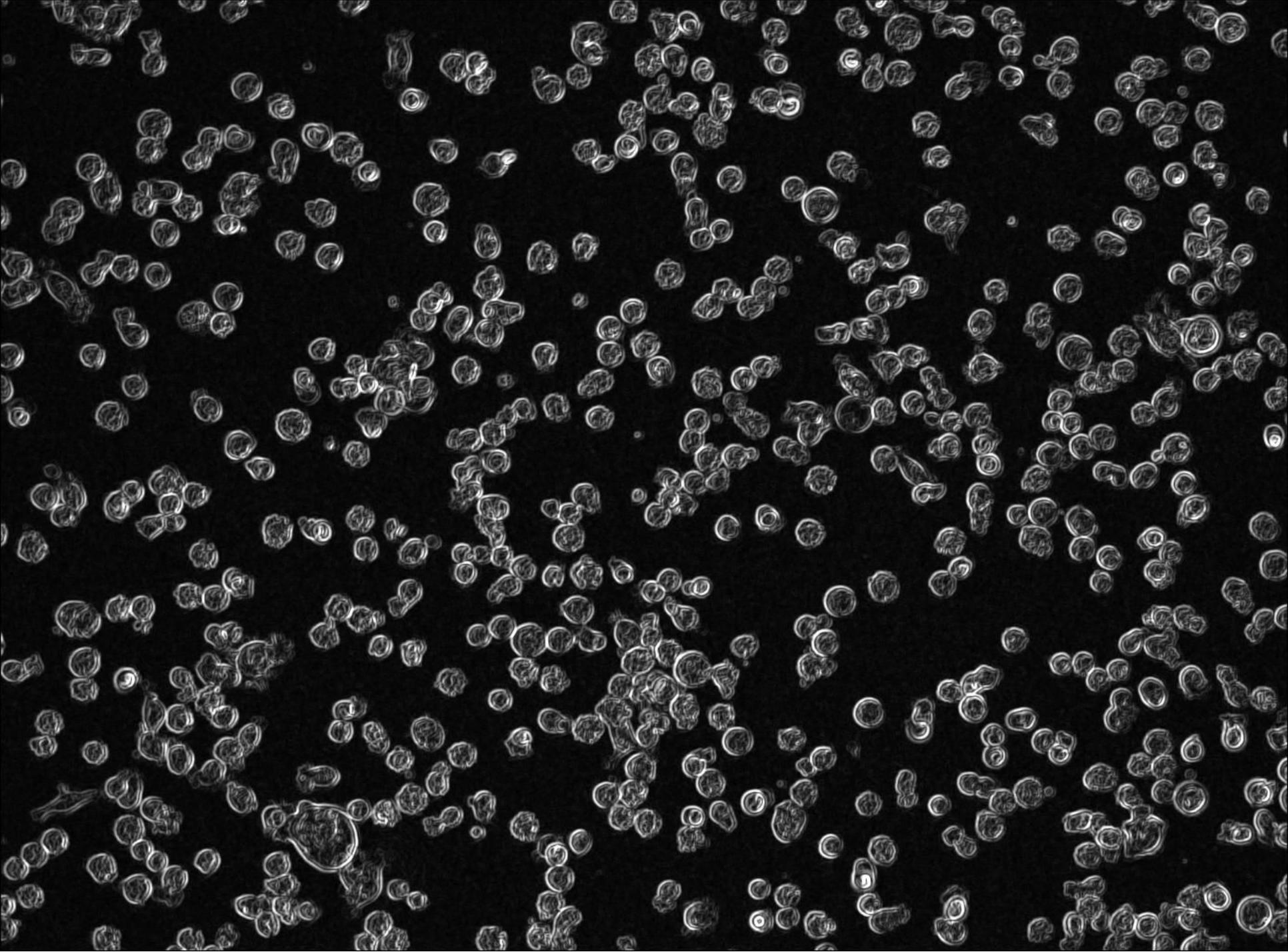
Extraction des vignettes & Classification

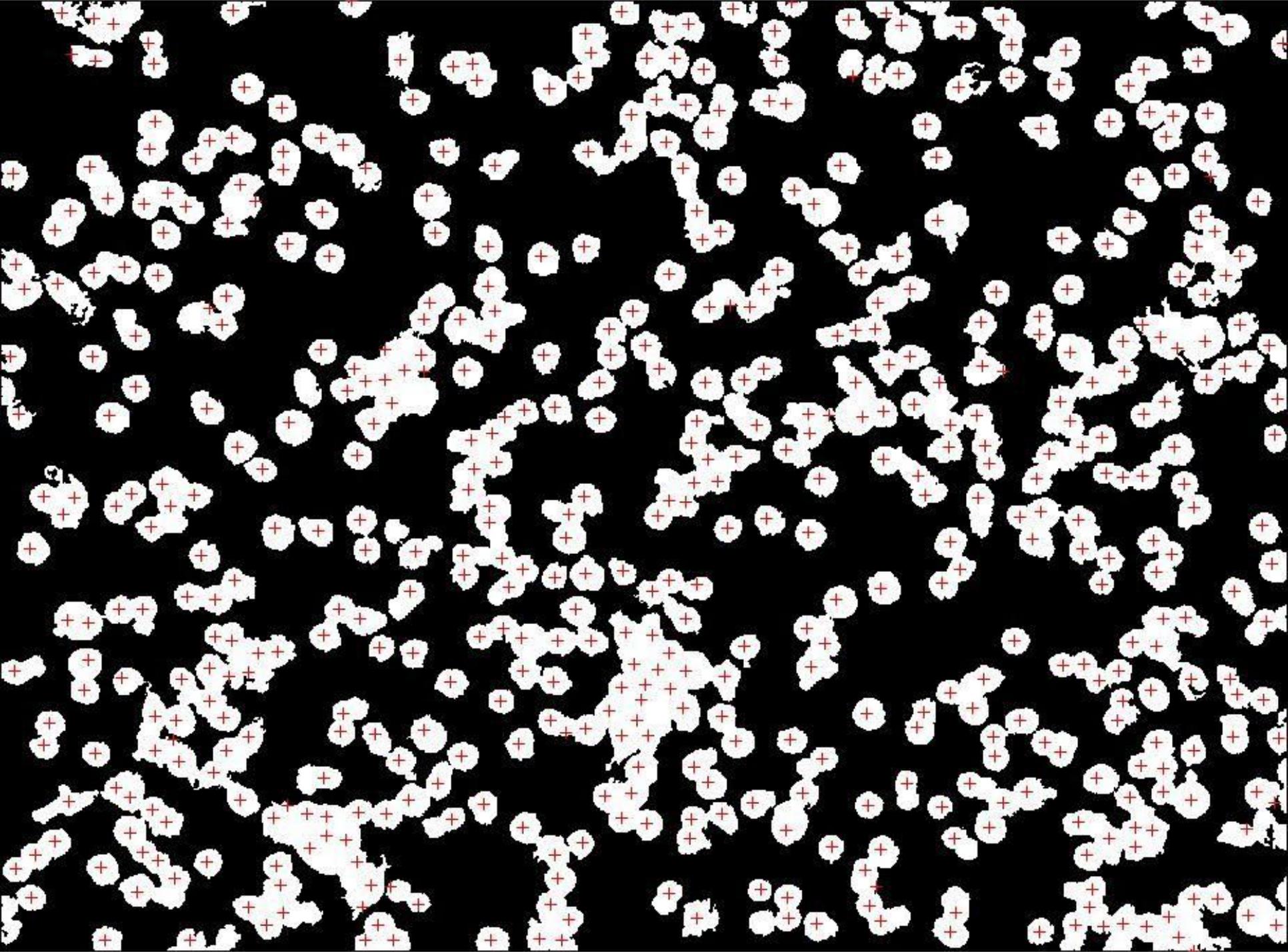
Segmentation par LPE

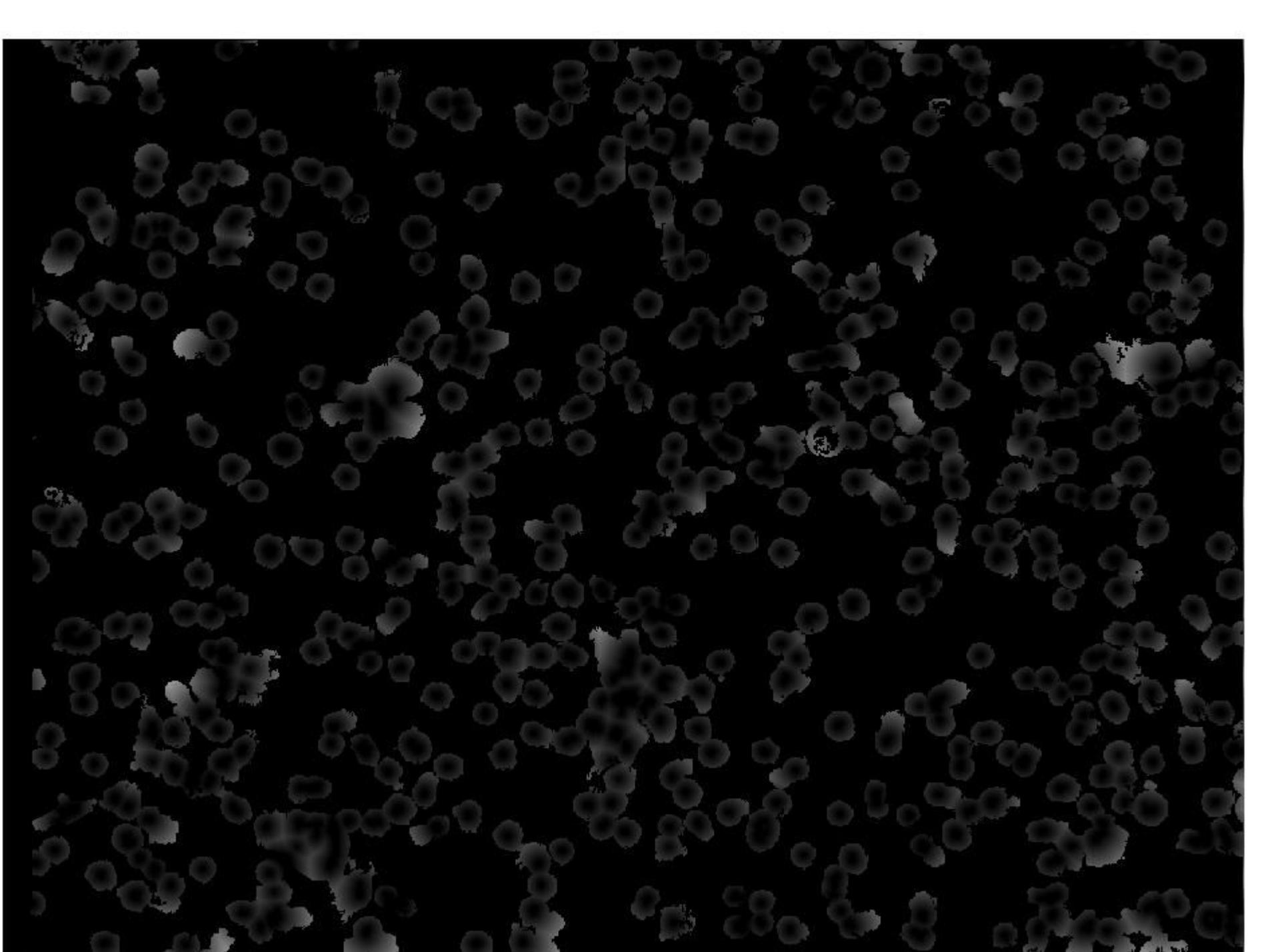
- Objectif : séparer les cellules les unes des autres à l'intérieur des composantes connexes
- Rappelons : on a besoin pour la LPE :
 1. *d'une fonction représentant l'image*
 2. *d'un ensemble de marqueurs*
- Nous utilisons pour l'étape 1 la distance de Chamfer (distance minimale aux marqueurs) des points sur une composante connexe
- Pour obtenir les marqueurs ou germes nécessaires à l'étape 2, on utilise les centres des cellules obtenus à partir de l'image des « Halo »

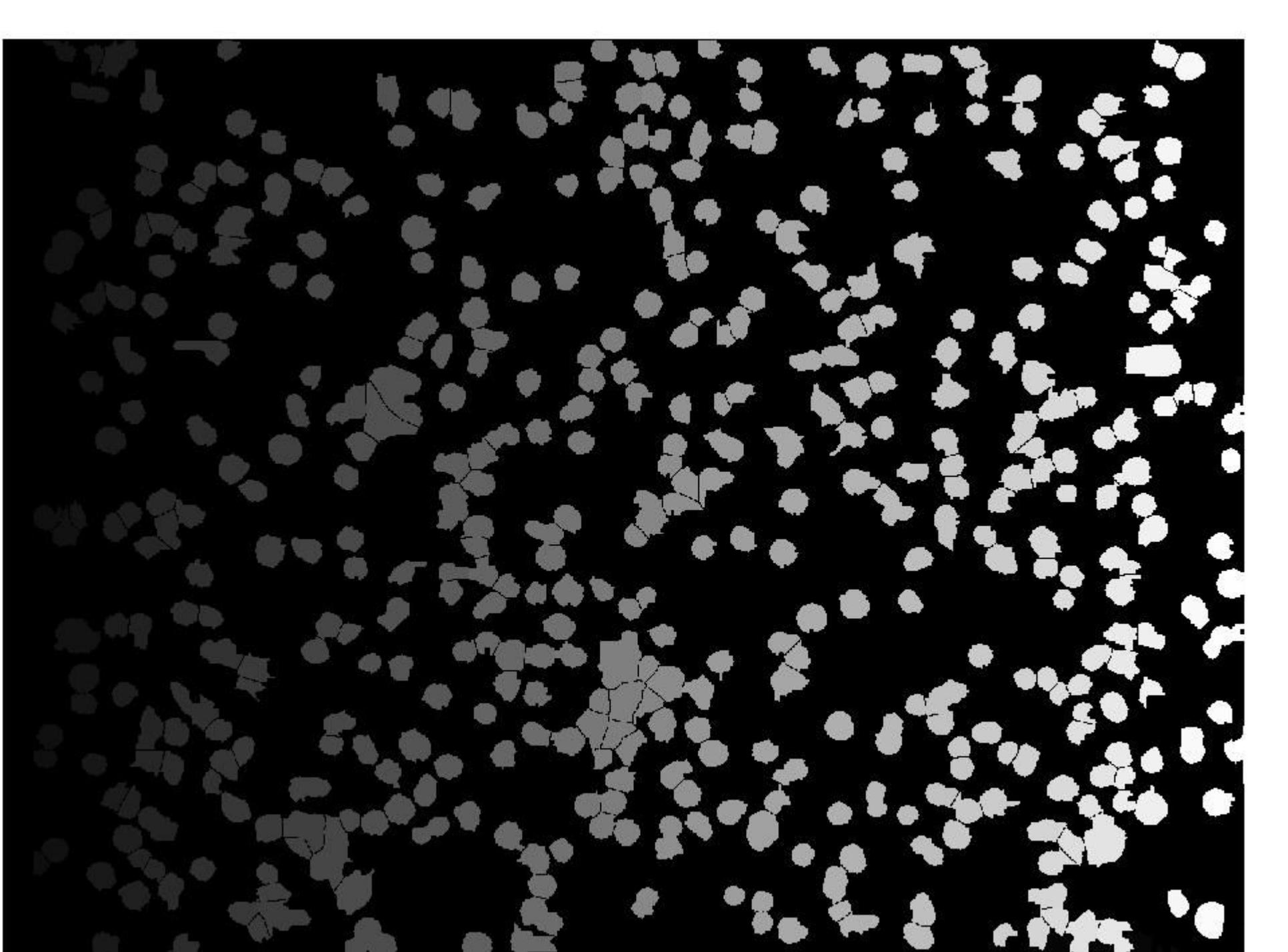






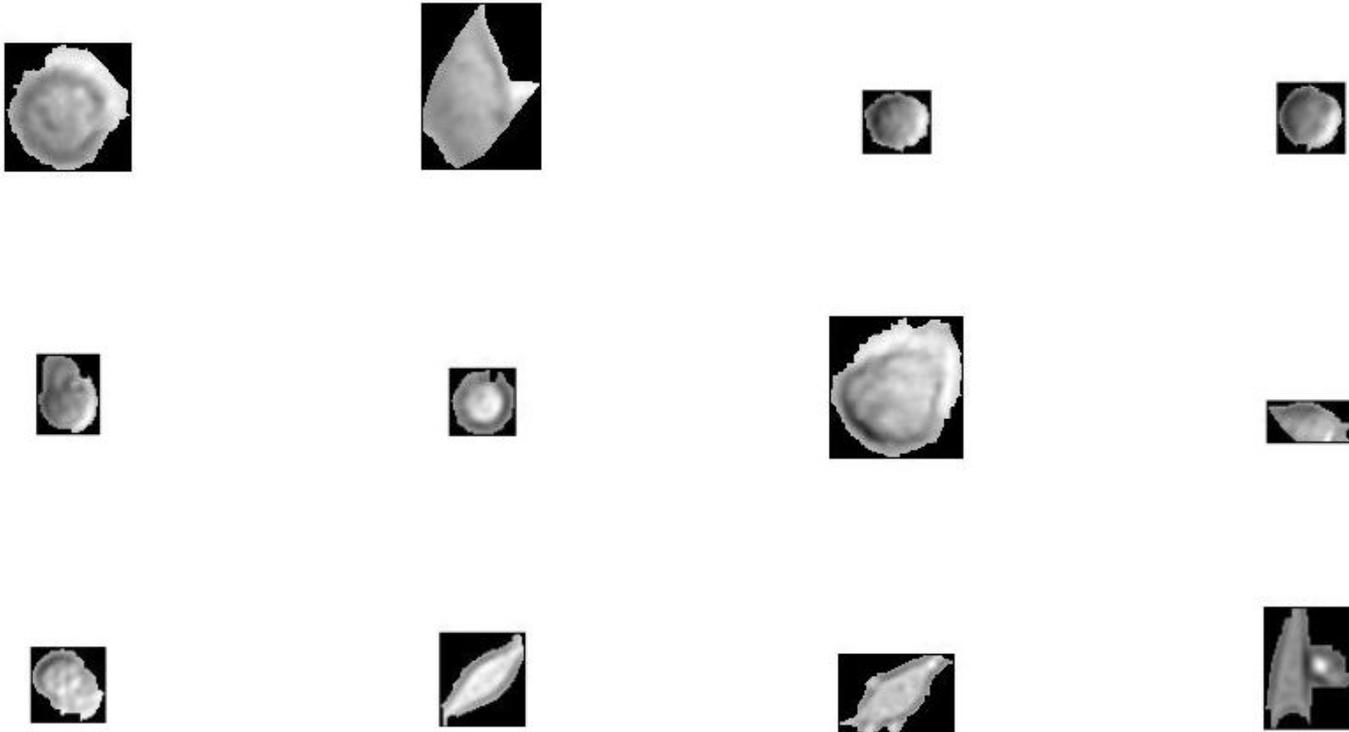






Extraction des vignettes & Classification

- Résultats de la segmentation par LPE: Exemple des cellules extraites (ou vignettes) :



Extraction des vignettes & Classification

- Définition : un **snake** est une courbe que l'on va déformer afin de suivre au plus près les bords ou contours des motifs présents dans l'image.
- La dynamique d'évolution du snake est basée sur la notion d'**énergie** interne et externe, le but étant de minimiser l'énergie totale présente le long de la courbe.
 - L'énergie interne correspond et aux caractéristiques de la courbe (courbure, longueur, ...).
 - L'énergie externe provient de l'image (présence de bords marqués, bruit, ...) ⇒ **elle attire la courbe vers les zones de fort gradient.**

Extraction des vignettes & Classification

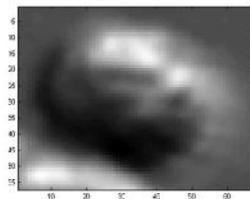
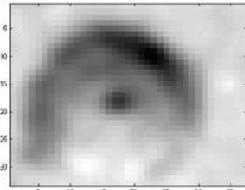
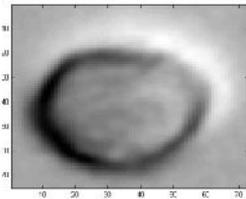
- Introduction de la notion de longueur géodésique

- Les zones de contour gradient dominant une énergie externe minimale:
$$l(C) = \int_C g(|\nabla I|) |C'(q)| dq$$

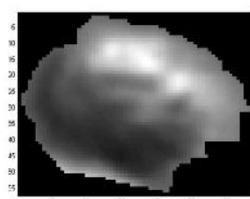
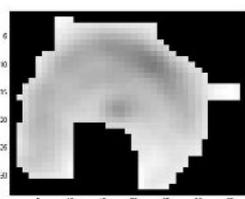
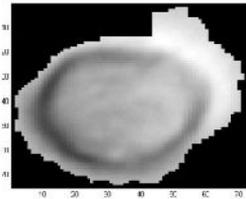
- Permet de définir la longueur géodésique
$$g(|\nabla I(x, y)|) = \frac{1}{1 + |\nabla G_\sigma(x, y) * I(x, y)|^2}$$
- Permet de scinder le snake

Extraction des vignettes & Classification

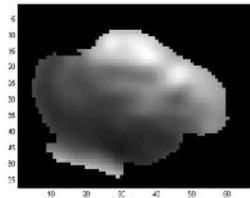
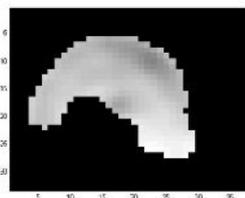
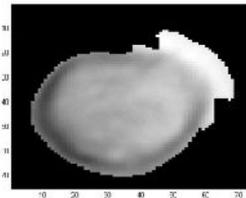
Raffinement de la segmentation par la méthode des «**Snakes**»



Zoom sur une cellule



Segmentation de la cellule par la LPE

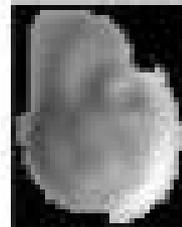


Raffinement de la segmentation par utilisation d'un *snake*

Extraction des vignettes & Classification

Classification

- Objectif de cette première classification : distinguer les cellules rondes des cellules étalées
- Pour caractériser la rotondité des cellules, 5 descripteurs morphologiques ont été retenus pour caractériser la forme de la cellule par rapport au rectangle englobant de la vignette



Extraction des vignettes & Classification

<i>Paramètre N°</i>	<i>Description</i>	<i>Formule</i>
1	Déviation entre la longueur « L » et la largeur « l » du rectangle englobant	$\frac{ L-l }{\min(l,L)}$
2	Rapport de la surface de la cellule « S » à la surface du rectangle englobant « Lxl »	$\frac{S}{L \times l} - \frac{\pi}{4}$
3	Distance entre le centre du rectangle (x _O ; y _O) englobant et le centre de la cellule (x _G ; y _G)	$\sqrt{(x_G - x_O)^2 + (y_G - y_O)^2}$
4	Rapport du carré du périmètre à la surface	$\frac{\left\{ \sum_x \sum_y g(x,y) \right\}^2 _{(x,y) \in \text{contour}}}{\sum_x \sum_y g(x,y) _{(x,y) \in \text{cellule}}}$
5	Mesure de convexité	$\text{moyenne} \left(\frac{\sum_x \sum_y g(x,y) _{(x,y) \in \text{extérieur}}}{\sum_x \sum_y g(x,y) _{(x,y) \in \text{contour}}} \right)$

Extraction des vignettes & Classification

- Premier essai de classification par la méthode des K-means⁹
- Vérité terrain constituée par plus de 3000 vignettes étiquetées par nos soins

	<i>Nombre total de cellules</i>	<i>Nombre de cellules rondes</i>	<i>Nombre de cellules longues</i>
<i>Vérité terrain</i>	3307	2181	1126
<i>Nombre de cellules correctement classées</i>	2713	2110	299
<i>Nombre de cellules mal classées</i>	594	71	827
<i>% de bonne classification</i>	82,04%	96,74%	26,55%
<i>% de mauvaise classification</i>	17,96%	3,26%	73,45%

Extraction des vignettes & Classification

Conclusion

- La méthode de segmentation permet d'obtenir un nombre significatif de vignettes par image
- Réponse satisfaisante sur les cellules rondes
- Résultats mauvais sur les cellules longues
- Segmentation des cellules longues à renforcer, puis recherche de paramètres morphologiques plus discriminants
- Test d'une autre méthode de classification

Plan de la présentation

- Position du problème
- Les images acquises
- Difficultés rencontrées
- Détection et comptage des cellules
- Extraction des vignettes & Classification
- ***Conclusions & Suites du travail***

Conclusions & Suites du travail

Conclusions

- Pour traiter la problématique proposée sans imposer de contraintes aux biologistes, nous avons développé un prétraitement adaptatif satisfaisant
- La conception d'un filtre spécifique permet de détecter déjà 85% des cellules présentes dans l'image
- La chaîne de traitements permettant d'arriver à la création de vignettes contenant les cellules à classer a fait ses preuves sur les cellules rondes

Conclusions & Suites du travail

Travaux encours

- Amélioration de la détection des cellules étalées → Combinaison filtre “Halo” et “Hough”?
- Limitation des détections erronées de centres et amélioration de la segmentation par une prise en compte de l’aspect textural dans la fonctionnelle d’énergie du snake.
- Recherche de paramètres plus discriminants entre cellules longues et étalées
- **Remarque: Ces trois aspects sont très liés!**
- Rendre le filtre “Halo” auto-adaptatif à la taille des cellules → Histogramme des rayons

Conclusions & Suites du travail

Travaux à venir

- Classification des cellules rondes entre blebbantes et lisses → Prise en compte de la texture et de l'irrégularité du contour
- Prise en compte des différents modes d'acquisition des images (x10, x40,...)
- Développement d'une interface conviviale pour les biologistes
- A terme l'objectif est une aide au diagnostic à partir de cultures de cellules prélevées au voisinage d'une tumeur → Nécessité de développer des paramètres fiables car la population à analyser sera de petite taille

Références

1. P. V. C. Hough. Methods and means to recognize complex patterns. U.S. Patent 3,069,654, 1962.
2. R. Pinzo'n, G. Garavito, Y. Hata, L. Arteaga, and J.D. Garcia. Development of an automatic counting system for blood smears. In Proceedings of the Congress of the Spanish Biomedical Engineering Society, pages 45–49, 2004.
3. N. Otsu. A threshold selection method from gray-level histograms. IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, 9(1):62–66, 1979
4. H. Digabel and C. Lantuejoul. Iterative algorithms. In Actes du Second Symposium Europeen d'Analyse Quantitative des Microstructures en Sciences des Materiaux, Biologic et Medecine, Caen, -7 October 1977
5. C. Lantuejoul. La squelettisation et son application aux mesures topologiques des mosaïques polycristallines. PhD thesis, Ecole des Mines, Paris, 1978.
6. M. Kass, A. Witkin, and T. Terzopoulos. Snakes: Active contour models. International Journal of Computer Vision, 1(4):321{331, 1987.
7. S. Osher and J. Sethian. Fronts propagating with curvature-dependent speed: Algorithms based on Hamilton-Jacobi formulations. Journal of Computational Physics, 79:12{49, 1988.
8. R. Malladi, J. A. Sethian, and B. C. Vemuri. Shape modeling with front propagation: A level set approach. IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 17(2):158{175, 1995.
9. J. B. MacQueen (1967): "Some Methods for classification and Analysis of Multivariate Observations, *Proceedings of 5-th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*", Berkeley, University of California Press, 1:281-297