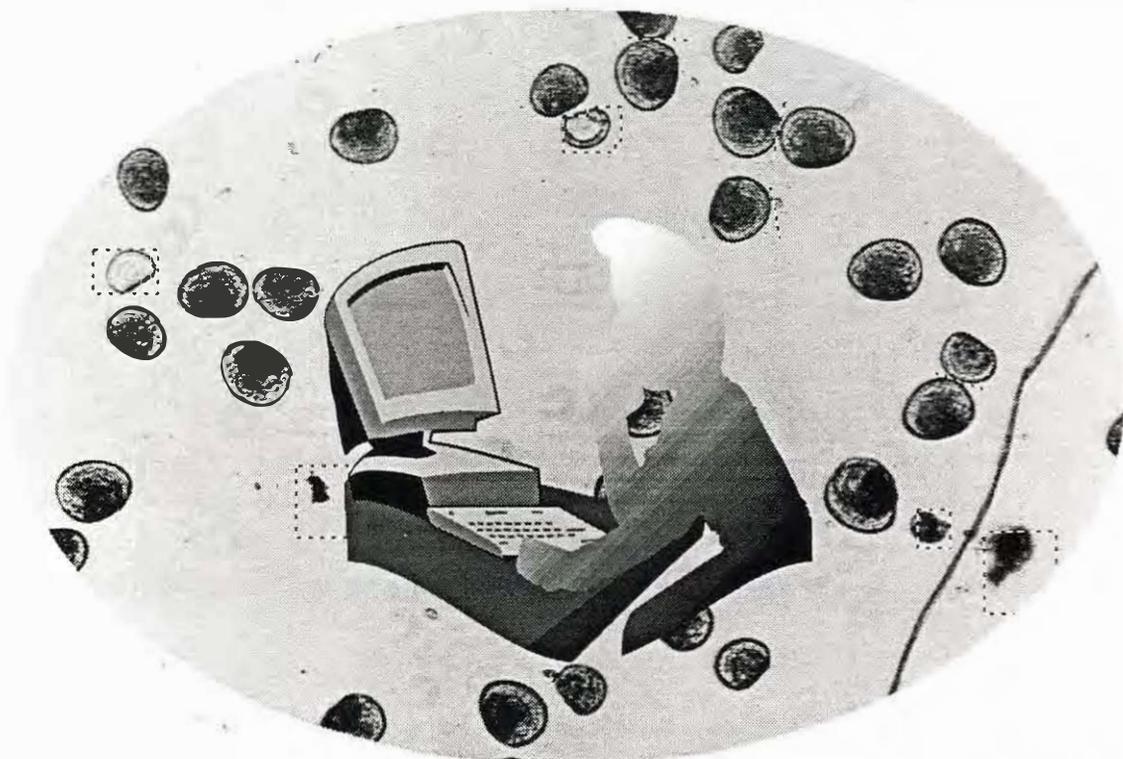


**SYstème de BIOMétrie Larvaire de bivalves
par analyse d'images**

Hélène de PONTUAL



Décembre 1994

**SYstème de BIOMétrie Larvaire de bivalves
par analyse d'images**

Hélène de PONTUAL

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER

IFREMER
Centre de Brest
 Station Pêche-Aquaculture
 BP 70,
 29280 PLOUZANE

DIRECTION DES RESSOURCES VIVANTES

AUTEUR (S) : Hélène de Pontual	CODE : DRV 94-23. RA/Brest
TITRE : SYstème de BIOMétrie Larvaire de bivalves par analyse d'images.	Date : Décembre 1994 Tirage nb : 50 Nb pages : 43 Nb figures : 8 Nb planches : 5
CONTRAT :	DIFFUSION : Libre X Restreinte Confidentielle

RESUME :

SYBIOL, SYstème de BIOMétrie Larvaire par analyse d'images a été développé pour la mesure semi-automatique de larves de bivalves.

L'intérêt majeur de ce type de méthodologie par rapport aux techniques classiques de mesure réside dans l'accessibilité à une information plus riche par l'extraction de paramètres tels que la surface ou le diamètre équivalent.

Cet outil est aujourd'hui utilisé en routine à l'écloserie expérimentale de mollusques d'Argenton. Sa description et son évaluation font l'objet de ce rapport.

ABSTRACT :

SYBIOL, SYstem of BIOMETRY of Larvae by image analysis, has been designed for measuring larvae of bivalves in a semi automatic way.

The main interest of this tool is to provide more information with the extraction of parameters such as area or equivalent diameter.

Our purposes are to describe and evaluate the system which is now operational and used in routine in the mollusc hatchery of Argenton.

mots clés : croissance, élevages larvaires, mollusques, analyse d'images

key words : growth, larval rearing, molluscs, image analysis

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	7
I. Configuration matérielle	9
I.1. Matériel	9
I.2. Logiciels.....	11
II. Développements méthodologiques.....	13
II.1. Acquisition et traitement de l'image	13
II.2. Traitement des données brutes.....	18
II.2.1. Menu de biométrie larvaire.....	18
II.2.2. Extraction des descripteurs.....	22
II.3. Remarques	24
III. Evaluation du système	27
III.1. Substitution méthodologique.....	27
III.1.1. Conditions.....	27
III.1.2. Validation.....	32
III.2. Apport spécifique dans la qualité de la représentation de la croissance.....	35
IV. Perspectives et conclusion.....	39
Bibliographie.....	41

INTRODUCTION

Initiés par Loosanoff et Davis (1963), les élevages larvaires de bivalves en éclosérie se sont considérablement développés (Bourne et *al.*, 1989; Le Borgne, 1989; Robert 1994). La compréhension des mécanismes impliqués dans la croissance larvaire dont l'intérêt est évident pour l'aquaculture, l'halieutique ou l'écologie repose essentiellement et toutes disciplines confondues sur l'analyse de différentiels de croissance. Ce type d'étude implique l'acquisition d'un volume important de données biométriques généralement opérée de façon "manuelle" à l'aide d'un micromètre oculaire ou d'un projecteur de profil. Les limites de cette approche sont multiples :

- les paramètres¹ accessibles sont peu nombreux et la croissance est communément représentée par la variation d'une dimension linéaire donnée (longueur ou largeur) dont le choix est souvent arbitraire.

La terminologie elle même n'est pas standardisée, les auteurs proposant différentes définitions de ces grandeurs (Cox 1969, Chanley et Andrews 1971, Le Penec 1978).

- le tri sélectif des individus soumis à la mesure sur des critères mal formalisés (la représentation du concept d'anomalie larvaire est par exemple variable d'un individu à l'autre), la tendance involontaire à sélectionner les individus présentant les plus fortes performances de croissance, la précision de l'ajustement visuel de l'axe de mesure sont, d'autre part, des facteurs qui introduisent un biais lié à l'opérateur difficilement quantifiable.
- longue, répétitive et fastidieuse, la saisie de l'information est enfin réduite à son minimum.

¹ au sens d'élément dont la connaissance explicite les caractéristiques essentielles d'un ensemble.

Ces constats suffisent à motiver l'évaluation des techniques de mesure par imagerie numérique susceptibles d'améliorer tant le confort de l'analyse que la richesse et la fiabilité de l'information recueillie.

A l'exception des travaux de Roegner (1988, 1991) concernant le suivi in situ de la croissance de postlarves de *Crassostrea virginica*, peu d'études ont été, semble-t-il, réalisées sur le sujet.

Sur l'initiative de l'écloserie expérimentale de mollusques d'Argenton, un prototype de comptage et de mesure automatique de larves de bivalves a dans un premier temps été étudié en collaboration avec l'Ecole Nationale Supérieure des Télécommunications de Bretagne (Gonzalez Jordan, 1991).

Ce projet n'a pas permis de déboucher sur un outil opérationnel pour une utilisation en routine du fait notamment d'une configuration matérielle insuffisante et d'algorithmes inadaptés.

SYBIOL, SYstème de BIométrie Larvaire par analyse d'images est un système de mesure semi-automatique développé sur la base matérielle disponible. La description et l'évaluation de cet outil actuellement opérationnel font l'objet de ce rapport.

I. CONFIGURATION MATERIELLE

I.1. Matériel

La chaîne d'acquisition et de traitement d'images (Fig. 1) est constituée des éléments suivants:

- ① microscope optique inversé Olympus IMT2 équipé d'une surplatine avec support de plaques de 24 puits dans lesquels sont stockés les échantillons ce qui diminue considérablement la manipulation et permet éventuellement le traitement différé.
- ② caméra CCD monochrome Sony XC-77CE.
- ③ moniteur réservé au contrôle de l'acquisition de l'image (choix du champ, réglages de lumière et mise au point).
- ④ micro-ordinateur Macintosh Ici possédant les caractéristiques suivantes:
 - unité centrale MC6830 à 25 Mhz , 8 Mo de RAM
 - coprocesseur à virgule flottante MC68882
 - disque dur interne (80 Mo), disque dur amovible (44 Mo).
 - carte de numérisation Neotech permettant l'acquisition d'images vidéo au format PAL (768H x 512V pixels) codées sur 8 bits soit 256 niveaux de gris. La conservation du format vidéo standard (4H:3V) permet l'obtention de pixels carrés, caractéristique importante si l'image doit être le support de processus de mesure (Inoué, 1986)
 - écran Radius couleur 20", la résolution standard d'un écran 13" étant insuffisante pour visualiser l'intégralité d'une image 768x512.

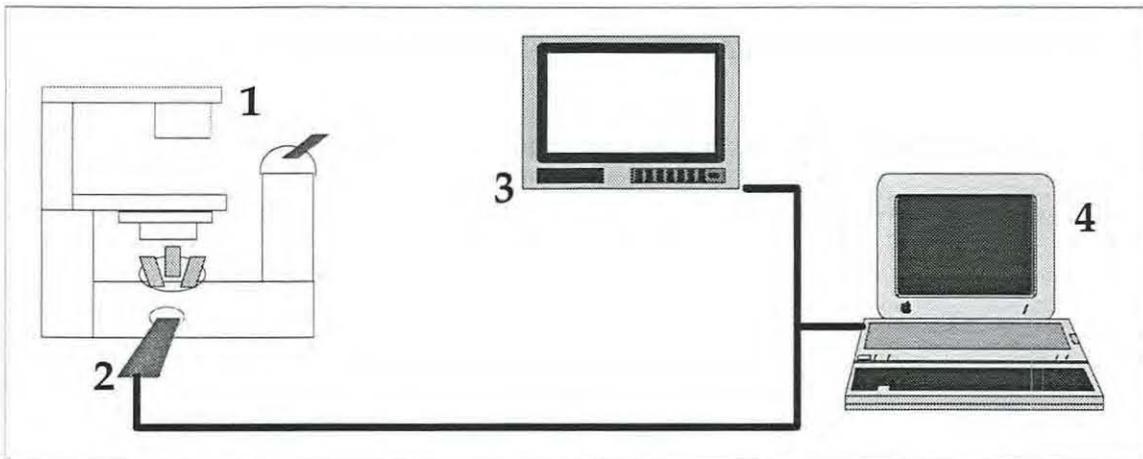


Fig. 1. Configuration matérielle (légende dans le texte).

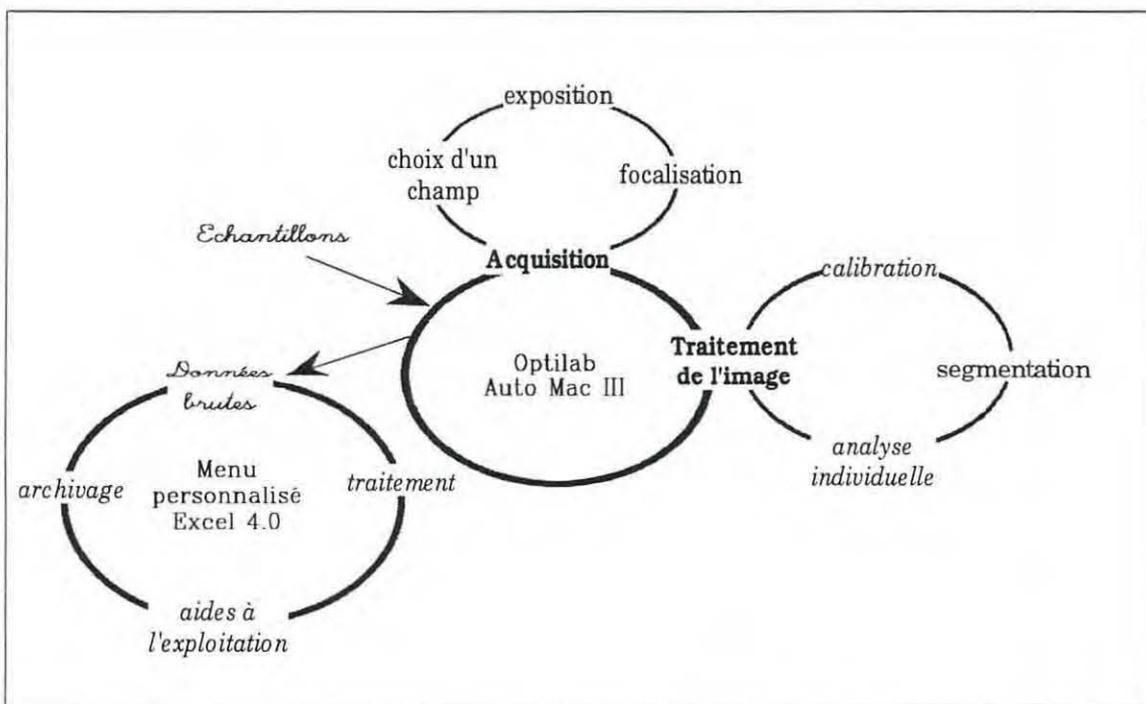


Fig. 2. Acquisition des données biométriques (en italique: étapes automatiques).

I.2. Logiciels.

L'acquisition de données biométriques s'articule autour de deux processus consécutifs (Fig. 2) : l'acquisition de données brutes (traitement des images) et l'extraction de l'information utile (description biométrique individuelle).

- Le traitement de l'image s'appuie sur **OptiLab**¹. Ce logiciel propose un large choix de fonctions préétablies et autorise la programmation de nouvelles primitives (fonctions dont on peut dériver d'autres fonctions de traitement d'images). Il ne supporte pas cependant la conception d'applications automatisées (pas de bibliothèque des primitives préexistantes ni d'éditeur de macro-commandes intégrés). Cette difficulté majeure a été contournée par l'écriture de macro-commandes sous **AutoMac III** qui permettent de rejouer de manière simple, rapide et conviviale la séquence d'acquisition et de traitement d'une image.
- Le traitement des données brutes, c'est à dire des fichiers paramètres issus des images traitées dans l'étape précédente. Le traitement purement interactif de ces données (e.g., extraction des paramètres utiles, des objets significatifs) n'est pas envisageable. La solution à ce problème a été apportée par l'écriture d'un menu personnalisé sous **Excel** (4.0), menu dont les commandes permettent en particulier le traitement de ces données de façon entièrement automatique après une étape rapide d'initialisation.

¹ OptiLab est un produit Graftek.

II. DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES.

II.1. Acquisition et traitement de l'image

L'algorithme a été défini sur la base de deux contraintes préalables : simplicité de mise en oeuvre, temps de traitement minimal.

Il est constitué d'une succession d'étapes interactives et automatiques (tableau 1). A chaque étape interactive, signalée par un message d'aide, la main est donnée à l'opérateur pour la réalisation d'une tâche particulière.

Du fait notamment de la nature pseudo-binaire (histogramme bimodal) des images originelles, les primitives retenues sont particulièrement simples et couramment utilisées dans ce type de problématique. En conséquence, les concepts sous-jacents ne seront pas détaillés ici. Le lecteur intéressé pourra consulter les ouvrages qui font référence en la matière (Rosenfeld et Kak 1976, 1978; Coster et Chermant 1985).

Préalablement au seuillage, l'opérateur doit procéder au "nettoyage" interactif de l'image c'est à dire à l'élimination des artefacts et à la séparation des larves connexes (i.e., jointives par un pixel ou point d'image au moins).

Le temps d'intervention requis est considérablement réduit par l'introduction de diverses procédures:

- mise en oeuvre, lors du traitement de l'image, de primitives permettant l'élimination des objets touchant le bord de l'image et la définition de seuils min. et max. de surface d'objets soumis à l'analyse individuelle.
- recours, lors du traitement ultérieur des données, à une base de critères de sélection des objets significatifs à partir d'attributs de taille et de forme.

La tâche de l'opérateur se réduit en conséquence à la séparation de larves connexes et à l'élimination d'objets individuels présentant des attributs de taille et de forme proches de ceux des larves analysées (e.g., larves mortes ou anormales).

A titre d'exemple, la planche 1 illustre les étapes interactives du traitement d'une image. La planche 2 montre les images initiale et finale classiquement obtenues lors du traitement d'un échantillon. Le temps de traitement de ce type d'image varie de 3 à 5 minutes.

Fonction	Etape (Statut)	Procédure	Objet	Primitives	Action de l'opérateur
F1	1 ☞	Acquisition	acquisition d'une image vidéo	Acquisition	cliquer sur le bouton d'acquisition
	2 ⊞	Calibration	définition des paramètres de l'image (taille du pixel notamment)	Calibration	
(F2)	3 ☞	Nettoyage de l'image	séparation des larves connexes, élimination des artefacts	Effacer ROI	définition de ROI (palette d'outils graphiques)
	4 ⊞	Préparation au seuillage	intégration des ROI précédemment isolées au fond de l'image)	Opérateurs arithmétiques et logiques	
	5 ☞	Seuillage	obtention d'une image binaire	Histogramme et seuillage	choix du seuil sur l'histogramme de l'image.
(F3)	6 ⊞	Détection et mesure	détection et mesure individuelle des objets (seuils min. et max. de surface individuelle, élimination des objets touchant les bords)	Remplissage de trous, détection mesure	
	7 ☞	Enregistrement des paramètres			nommer le fichier a créer
F4	8 ⊞	Fermeture des images en cours		Fermer image	
F1 ou Quitter					

Tableau 1:algorithme d'acquisition et de traitement d'une images de larves de bivalves. (☞ : interactive; ⊞ : automatique; ROI : région d'intérêt. Les fonctions F2 et F3 permettent, si nécessaire de retravailler l'image à différents niveaux).

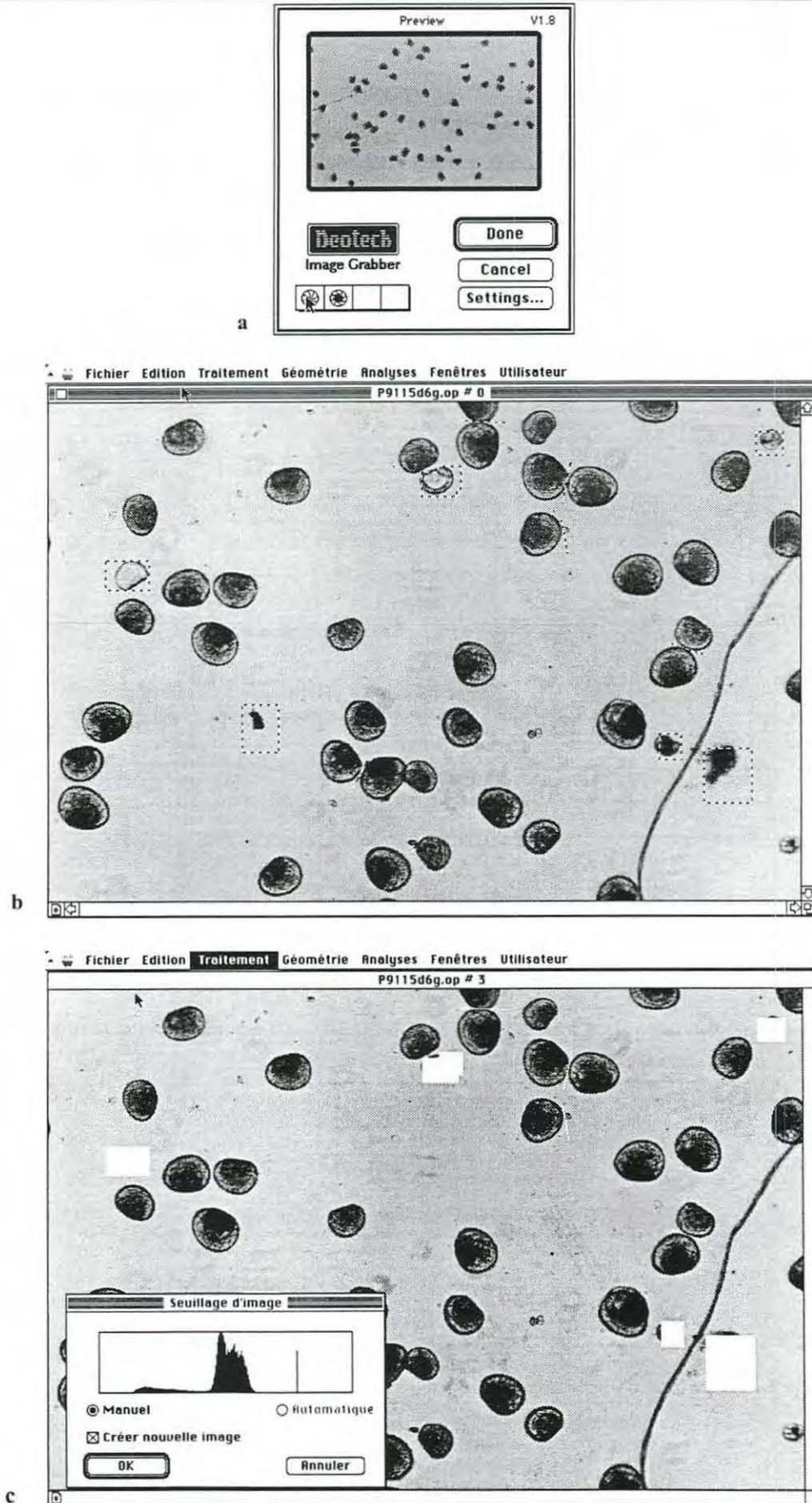


Planche 1. Traitement d'une image de larves de bivalve.
 a- acquisition (fenêtre de prévisualisation - image "live").
 b- définition de régions d'intérêt (en pointillé)
 c- seuillage de l'image sur l'histogramme.

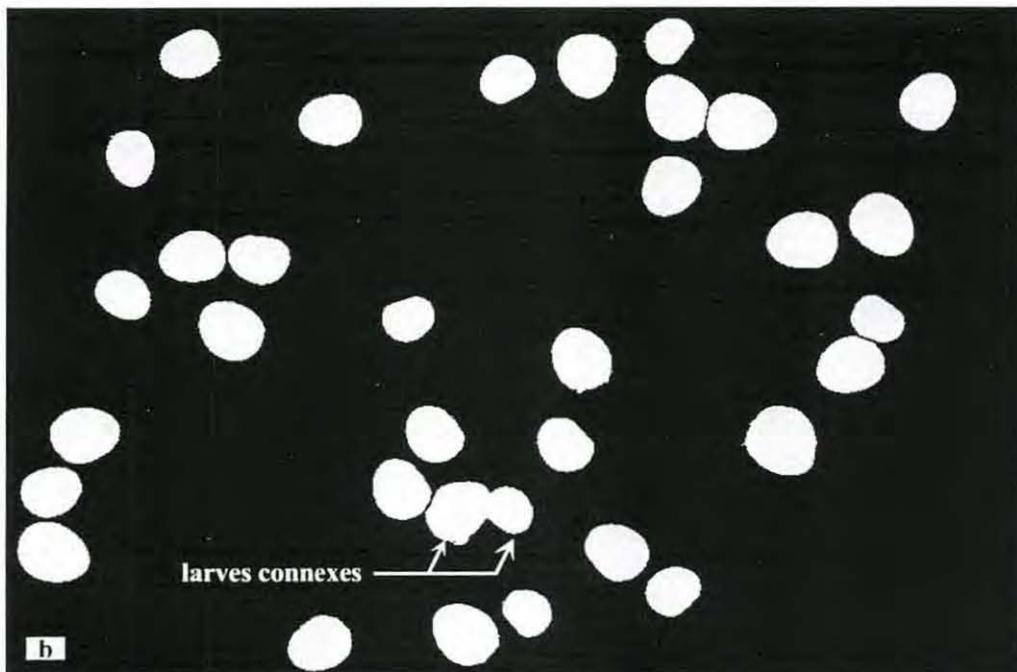
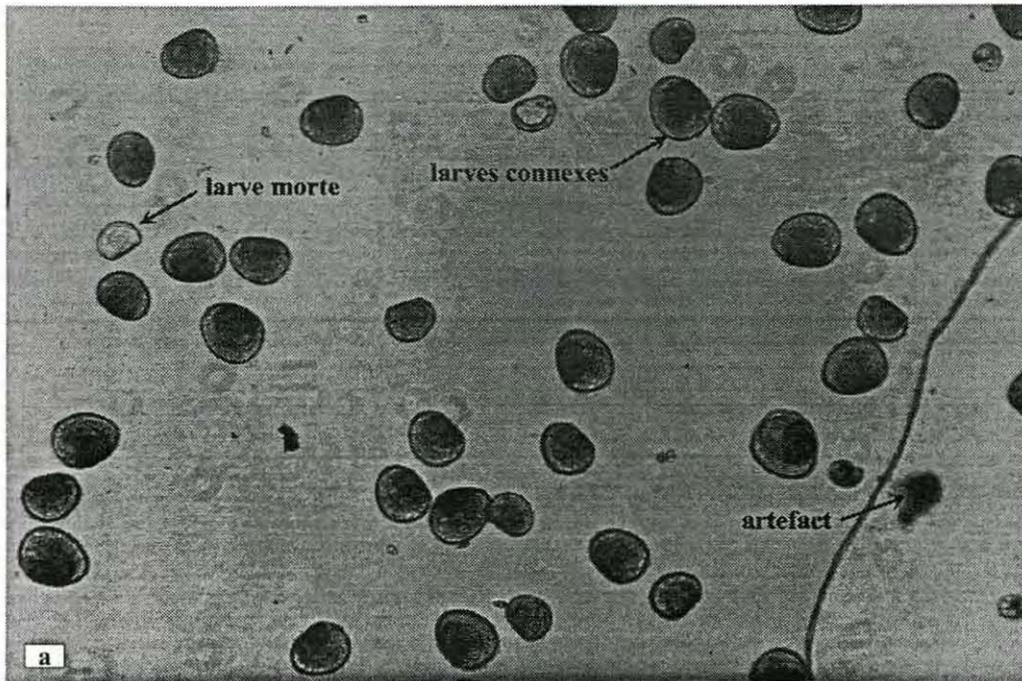


Planche 2. Acquisition et traitement d'images de larves de bivalves:
a- image originale
b- image finale et mesure individuelle. Nota: les larves connexes
seront détectées dans l'étape suivante du traitement.

II.2. Traitement des données brutes

II.2.1. Menu de biométrie larvaire.

La mesure individuelle sous OptiLab génère pour chaque image un fichier où chaque objet détecté est décrit par 48 paramètres.

Il n'existe pas, à ce niveau, de possibilités de fusion des fichiers correspondant à un même échantillon ni de sélection des paramètres utiles.

En conséquence, le suivi d'une expérience donnée multiplie le nombre de fichiers à traiter dans des proportions telles qu'ils deviennent quasiment ingérables de façon purement interactive.

Ce simple constat a conduit au développement d'un ensemble de commandes sous Excel permettant le traitement entièrement automatique des données après une rapide étape d'initialisation.

La nécessité d'optimiser (insertion du protocole expérimental en particulier) et de standardiser l'archivage des données, de visualiser rapidement les dynamiques de croissance et de prévoir l'évolution du système pour l'analyse de nouvelles espèces a suscité le développement de fonctionnalités supplémentaires.

Le tableau 2 présente une synthèse des fonctionnalités disponibles, l'articulation des différentes commandes étant décrite dans la figure 3.

La figure 4a illustre le menu de biométrie larvaire conçu comme un ensemble cohérent et évolutif. Les figures 4 b,c,d montrent, en outre, des exemples de dialogue d'initialisation de quelques unes des commandes.

Contraintes	Processus	Commande
Archivage des données	Décrire le protocole (caractéristiques générales et description des lots)	Protocole
Traitement des données : 1 plaque \Leftrightarrow m échantillons ($m \leq 24$) 1 échantillon \Leftrightarrow n images 1 image \Leftrightarrow p objets 1 objet \Leftrightarrow 48 paramètres	Pour chaque échantillon: - fusionner n fichiers paramètres - Extraire paramètres utiles - Extraire les objets significatifs - Calculer statistiques élémentaires Classer m échantillons par ordre alphabétique et chronologique Insérer le protocole	Traitement
Traitement des données : 1 expérience \Leftrightarrow l plaques	Si $l > 1$, fusionner données des l plaques. Classer les échantillons par ordre alphabétique et chronologique	Fusion
Archivage des données	Saisie de données complémentaires (mortalités, observations spécifiques)	Traitement
Traitement des répliqués		Duplicats
Visualisation des résultats	Tracé automatique de courbes de croissance avec intervalles de confiance (paramètre: longueur ou diamètre équivalent).	Courbe de croissance
Evolution du système	Définition de nouveaux critères de sélection (nouvelle espèce par ex.) Enregistrement de ces critères dans la base de données permanente	Calibration Nouveaux critères

Tableau 2: Description des différentes commandes du menu personnalisé Excel de biométrie larvaire.

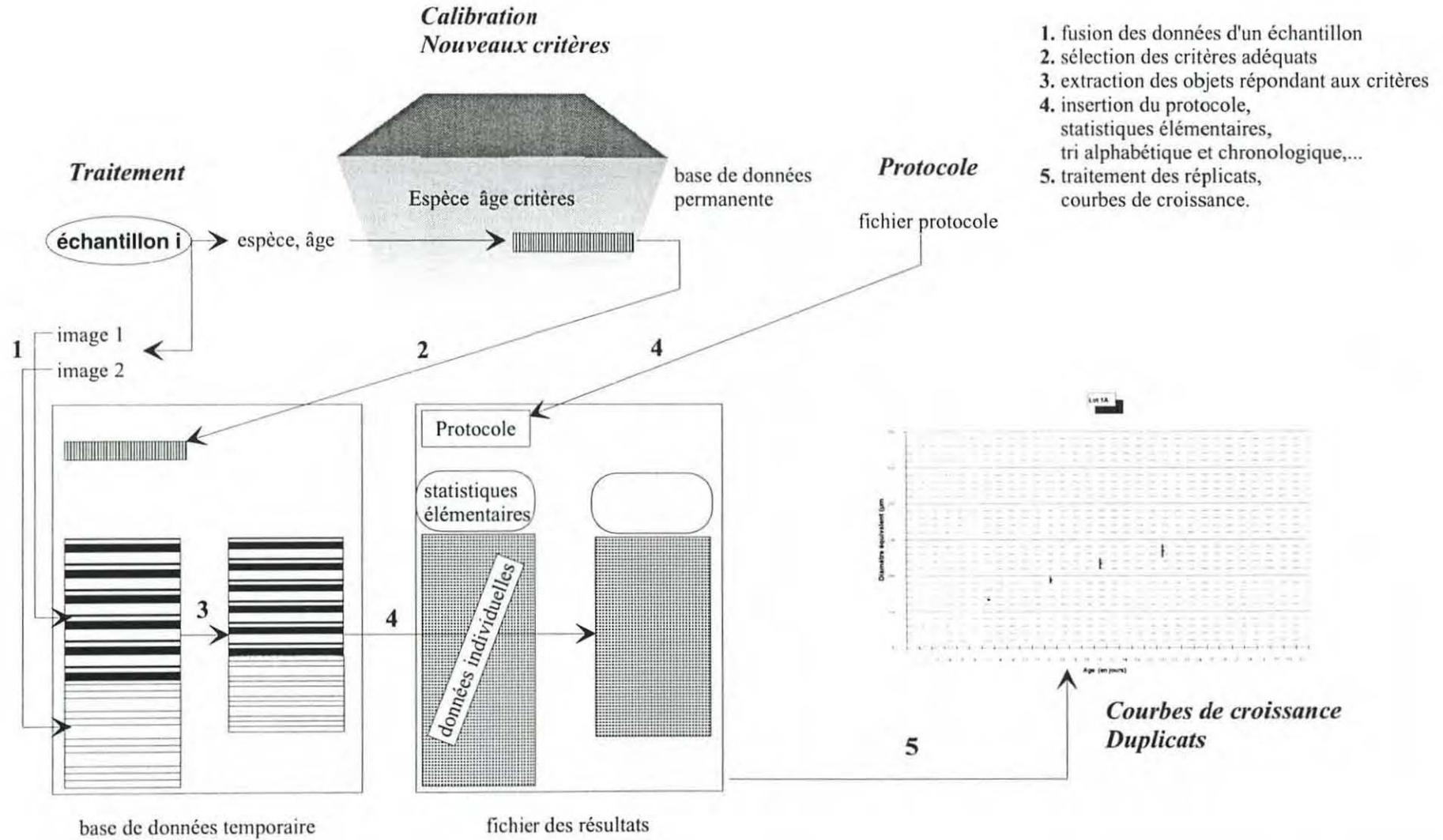
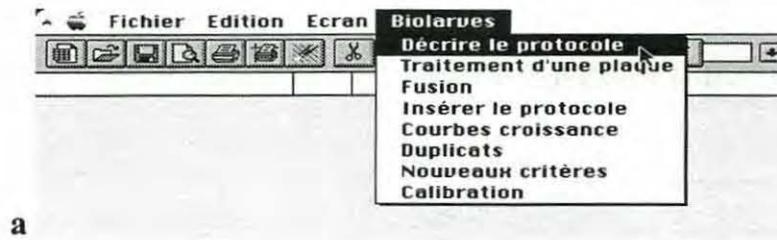


Fig. 3. Articulation des différentes commandes du menu de biométrie larvaire.



a

b

c

d

Fig. 4. Menu personnalisé (a) et exemples de boîtes de dialogue : commande protocole (b), commande traitement d'une plaque (c), commande courbe de croissance (d).

II.2.2. Extraction des descripteurs.

Parmi les paramètres disponibles dans un fichier de mesures issu d'OptiLab, on retient quatre descripteurs de taille et deux indices de forme, adimensionnels :

- la surface totale A de l'objet.
- la longueur calculée L_c ou longueur du plus grand segment à l'intérieur de la larve.
- la largeur calculée W_c ou petit axe de l'ellipse équivalente dont la surface A est égale à celle de la larve (ou plus exactement à celle de sa projection plane) et le grand axe au plus grand segment L_c :
$$W_c = 4A / (\pi L_c)$$
- le diamètre équivalent D_e ou diamètre du disque ayant la même surface que la particule :
$$D_e = 2\sqrt{A/\pi}$$
A noter l'intérêt de ce paramètre calculé à partir de la surface et de dimension 1.
- l'indice de compacité I_c défini comme le rapport de la surface de la particule sur la surface du "plus petit rectangle" l'incluant.
- le facteur type I_t , facteur complexe liant la surface de la particule à la matrice d'inertie.

Les attributs de taille et de forme A , L_c , I_c et I_t sont utilisés lors du traitement des données pour l'extraction des objets significatifs (larves dont on souhaite obtenir la mesure). Déterminés lors d'études de calibration, ces critères de sélection, variables en fonction de l'espèce étudiée et de l'âge des échantillons observés, sont introduits dans une base de donnée permanente (Fig. 3) qui peut être enrichie ultérieurement.

Cette utilisation de la reconnaissance de forme par une approche paramétrique simple permet le rejet d'objets dont la taille et la forme diffèrent significativement de celles des larves (débris d'algues microphytes, amas de larves chevauchantes par exemple) : il n'est donc pas nécessaire de les éliminer "manuellement" pendant la phase de traitement des images.

In fine, seuls sont archivés les descripteurs L_c , W_c et D_e , ce dernier permettant de recalculer au besoin la surface A des larves mesurées. Les échantillons sont enfin triés par ordre chronologique et alphabétique, les statistiques élémentaires (moyenne, écart-type) étant calculées par ailleurs (Fig. 5).

A partir de ce type de fichier, le tracé automatique de courbes croissance permet une appréciation rapide des dynamiques de croissance obtenues (Fig. 6).

Réf. manip.: P9402(Manta) Date ponte: 23/03/94 Site: Argenton Volume: béchers (2)

Lot: 10A
 Espèce: Pecten maximus
 Origine: Brest
 Conditionnement: Géniteurs conditionnés à Argenton depuis Décembre 93
 T (°C): 18
 Reg. alim.: T.Iso. Cadarache
 Remarques: Larves à jeun du 28 au 30/03/94

échantillon: 10A (J07)			échantillon: 10A (J12)			échantillon: 10A (J16)		
mortalité.: 1.8 %			mortalité.: 5 %			mortalité.: 6.6 %		
obs.: néant			obs.: néant			obs.: néant		
Long. (µm)	Haut. (µm)	D. éq. (µm)	Long. (µm)	Haut. (µm)	D. éq. (µm)	Long. (µm)	Haut. (µm)	D. éq. (µm)
124.44	99.45	111.21	139.66	115.54	126.96	145.82	122.26	133.44
5.75	5.13	4.45	9.94	7.82	7.77	13.38	12.05	11.89
52	52	52	48	48	48	63	63	63

Long. (µm)	Haut. (µm)	D. éq. (µm)	Long. (µm)	Haut. (µm)	D. éq. (µm)	Long. (µm)	Haut. (µm)	D. éq. (µm)
129.03	98.44	112.70	137.20	121.09	128.89	154.07	138.47	146.06
119.14	89.41	103.21	139.83	109.01	123.46	142.82	113.19	127.15
113.31	89.56	100.73	137.33	116.46	126.46	130.70	118.06	124.22
110.20	93.78	101.66	139.89	121.55	130.40	126.41	106.08	115.80
123.22	97.12	109.39	133.83	114.54	123.81	160.15	125.10	141.54
119.71	91.28	104.53	135.82	111.80	123.23	143.84	126.64	134.97
126.64	110.45	118.27	148.05	116.89	131.56	137.38	125.03	131.06
123.91	106.36	114.80	150.00	115.19	131.45	147.22	127.56	137.04
122.98	94.48	107.79	133.80	115.00	124.04	137.23	120.96	128.84
123.79	108.79	116.05	123.26	109.84	116.36	150.29	122.27	135.55
126.84	103.79	114.73	129.99	102.49	115.42	135.38	101.61	117.29
135.38	98.94	115.74	146.52	109.75	126.81	160.79	139.24	149.62
123.58	101.97	112.25	145.79	117.62	130.95	146.00	114.79	129.45
132.95	98.36	114.36	133.16	101.79	116.42	154.07	137.91	145.76
120.59	105.69	112.90	142.18	108.12	123.99	157.42	133.51	144.97
116.69	95.00	105.29	119.53	101.56	110.18	163.54	128.07	144.72
129.99	103.27	115.86	139.93	110.58	124.39	143.22	112.57	126.98
126.27	94.43	109.19	140.36	119.91	129.73	126.41	110.08	117.96
126.29	107.09	116.30	145.45	116.71	130.29	134.02	122.35	128.05
122.98	94.72	107.93	140.12	129.18	134.54	142.43	117.76	129.51
125.50	97.53	110.64	143.63	120.30	131.45	163.51	143.19	153.01
117.23	104.29	110.57	139.83	106.84	122.23	165.59	127.70	145.42
129.77	99.78	113.79	146.47	121.41	133.35	133.71	110.76	121.69
129.03	97.77	112.32	123.58	104.30	113.53	150.19	120.52	134.54
126.27	96.37	110.31	140.60	120.73	130.29	146.81	118.48	131.88
132.85	97.03	113.53	123.96	112.71	118.21	197.20	154.88	174.77
125.16	91.91	107.26	143.39	123.21	132.92	150.86	137.97	144.27
120.33	97.52	108.33	140.25	114.34	126.64	156.16	127.28	140.98
116.92	100.49	108.40	145.79	112.67	128.16	137.32	126.24	131.66
127.05	108.50	117.41	148.78	114.19	130.34	140.70	126.69	133.52

Fig. 5 . Extrait d'un fichier issu des procédures Traitement/Fusion.

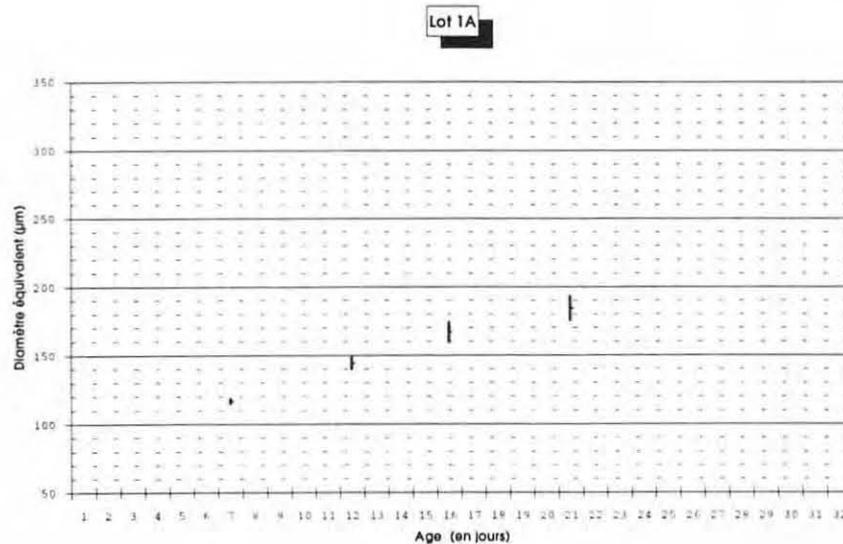


Fig. 6 . Exemple de tracé automatique de courbe de croissance

II.3. Remarques

La simplicité de l'algorithme mis en oeuvre dans la phase d'acquisition des données brutes découle principalement du fait que l'étape délicate du traitement de l'image ("nettoyage") reste confiée à l'expertise de l'opérateur.

Traduite en terme de "temps d'analyse", l'efficacité du système apparaît hautement liée à un certain nombre de facteurs exogènes qu'il convient de bien maîtriser :

- la concentration des échantillons. Dans le cas d'une faible concentration (i.e., peu de larves dans un champ) le nombre d'images à traiter devient trop important. A l'inverse, une forte concentration génère souvent des chevauchements et connexités de larves qui compliquent singulièrement l'étape interactive de nettoyage de l'image. Actuellement, le nombre d'images par échantillon est généralement réduit à 1, en particulier pour les stades jeunes.
- la "propreté" des prélèvements : les phénomènes de cristallisation du conservateur doivent notamment être évités.
- la qualité de l'image à l'acquisition. La qualité de la focalisation et de l'exposition conditionne notamment les résultats des étapes ultérieures de segmentation et de mesure.
- l'habitude de l'opérateur enfin.

Concernant l'extraction de l'information utile (traitement des données brutes), la contrepartie d'une automatisation des procédures de traitement réside dans le respect d'une syntaxe rigoureuse, largement explicitée dans le manuel d'utilisation du système rédigé à l'intention des utilisateurs. Différents outils d'aide à l'organisation du travail sont par ailleurs proposés.

D'un point de vue algorithmique, le seul point "sensible" de l'approche retenue concerne le processus mis en oeuvre pour le rejet automatique d'un certain nombre d'artefacts. Sa fiabilité est liée :

- au choix des critères de sélection. On remarquera à ce titre que les indices I_c et I_l sont, par définition, invariants pour la translation et l'homotéthisme. Par contre, ils ne le sont pas pour la rotation ce qui en réduit à priori l'intérêt pour la reconnaissance de formes à l'orientation aléatoire. On a cependant vérifié que leurs domaines respectifs de variation sont restreints pour les formes étudiées (sphéroïdales) quelle qu'en soit l'orientation. Utilisés conjointement à des facteurs de taille (A et L_c), ils permettent l'élimination de la majorité des artefacts. Ces indices ont été préférés à ceux calculés à partir du périmètre (e.g., facteur circulaire d'Heywood, rayon hydraulique) de moindre robustesse .

- à une évaluation correcte des plages de variations des critères retenus pour les formes étudiées. Cette évaluation, nécessairement empirique, doit faire l'objet d'études de calibration particulièrement soigneuses.

III. EVALUATION DU SYSTEME

La mise au point et l'évaluation du système ont été réalisées à l'écloserie expérimentale de mollusques d'Argenton lors du suivi d'élevages larvaires de différentes espèces de bivalves : coquille St Jacques (*Pecten maximus*) principalement, coquille japonaise (*Patinopecten yessoensis*), palourdes (*Ruditapes decussatus* et *R. philippinarum*), huître japonaise (*Crassostrea gigas*).

Si l'évaluation fine de l'outil développé (et sa valorisation) ressort des utilisateurs, son utilisation rationnelle suppose cependant l'examen préalable de deux types de questions:

- 1- Dans quelles conditions cette méthodologie peut-elle se substituer à la technique de mesure classique ?
- 2- Quel est son apport spécifique dans la qualité de la représentation de la croissance ?

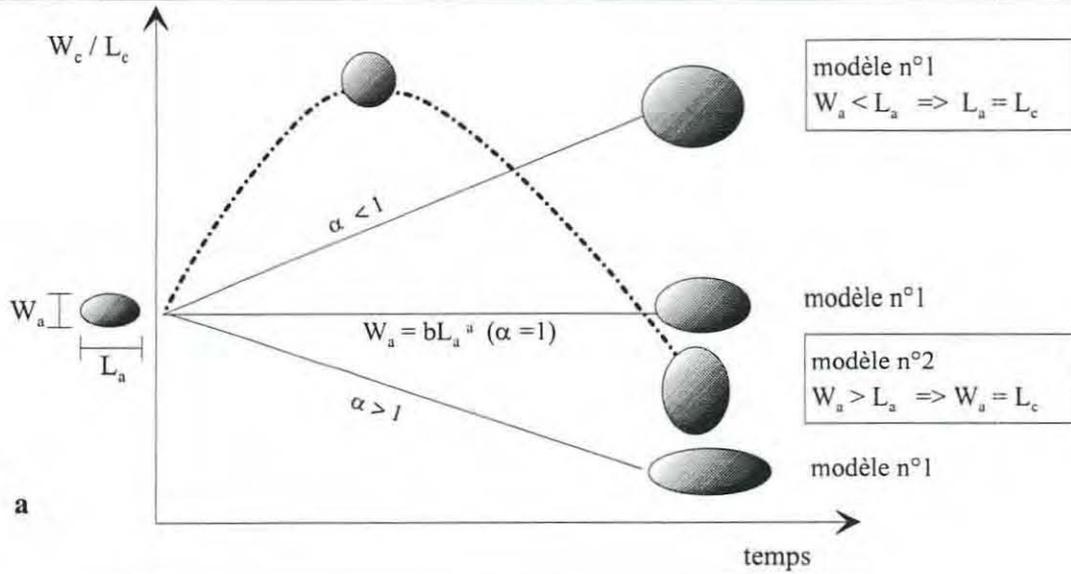
III.1. Substitution méthodologique.

III.1.1. Conditions.

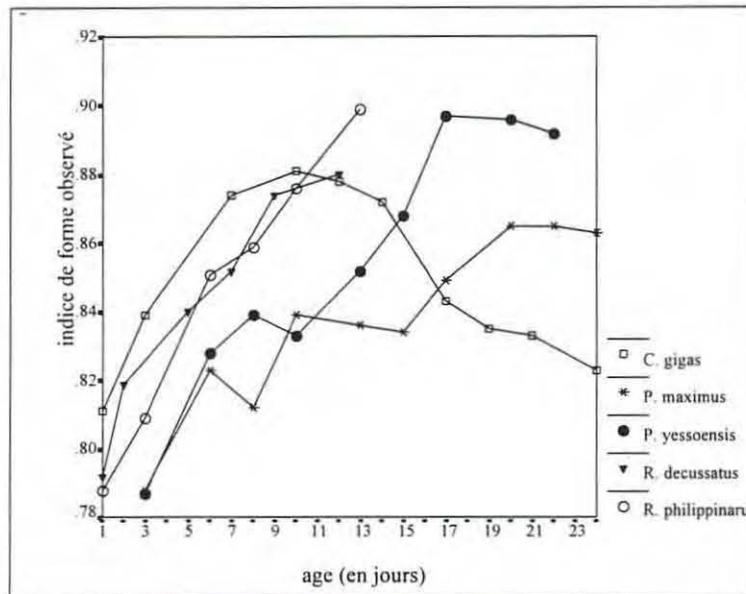
La substitution méthodologique suppose l'équivalence des grandeurs mesurées par l'une et l'autre des techniques. Il convient, en d'autres termes, d'établir les conditions de l'existence d'une homologie entre les descripteurs classiques, longueur L_a et largeur W_a , définis sur des bases anatomiques et les descripteurs L_c et W_c dont la définition est géométrique.

Cet exercice requiert l'analyse des transformations morphologiques associées à la croissance et leurs implications sur la géométrie de la larve.

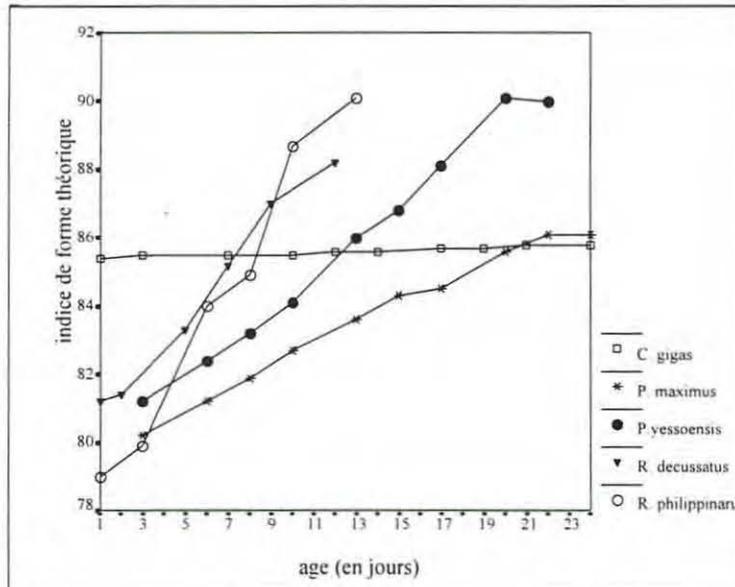
Concernant la larve D, la correspondance entre longueur anatomique et longueur géométrique peut être établie quelle que soit l'espèce. La plus grande dimension de la larve présente en effet à ce stade une orientation stable, antéro-postérieure, parallèlement à la charnière.



a



b



c

Fig. 7. Variations de l'indice d'allongement associé à la croissance
 a. modèles théoriques.
 b. indices observés
 c. indices théoriques correspondants.

S'agissant des stades plus âgés, la recherche de correspondances entre la géométrie et l'anatomie conduit à la distinction artificielle de deux types de morphogenèse larvaire :

- lorsque la plus grande dimension conserve une orientation antéro-postérieure (modèle 1), l'équivalence entre les longueurs anatomique et géométrique est conservée avec une définition de la longueur anatomique au sens de Cox (1969) (i.e., plus grande dimension dans le champ antéro-postérieur). A défaut d'équivalence, la relation entre les paramètres W_a et W_c pourra être analysée en terme de corrélation.
- chez les espèces qui présentent une allométrie de croissance telle que l'orientation de la plus grande dimension devient dorso-ventrale au cours du développement larvaire (modèle 2), il n'y a pas de correspondance stable entre la géométrie et l'anatomie : la relation initiale bascule vers une correspondance entre longueur géométrique et largeur anatomique.

L'affectation d'un modèle à une espèce donnée peut se faire sur la base des données disponibles dans la littérature (e.g., Loosanoff *et al.*, 1966 ; Le Pennec 1978).

Par ailleurs, si l'indice d'allongement de son ellipse équivalente, défini par le rapport des axes W_c et L_c , permet de caractériser la forme d'une larve, les variations de cet indice en fonction du temps autorisent une représentation des transformations morphologiques associées à la croissance. La figure 7a propose un schéma théorique des variations associées aux deux modèles de morphogenèse distingués précédemment. En parallèle, la figure 7b montre l'évolution en fonction du temps de l'indice d'allongement moyen $I_{ob} = \overline{W_c} / \overline{L_c}$ observée sur des élevages larvaires de différentes espèces. Ces résultats permettent d'établir que les Pectinidés *Pecten maximus* et *Patinopecten yessoensis* et les Vénéridés *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* répondent au modèle 1. L'Ostreidé *Crassostrea gigas* répond au modèle 2 : l'allure parabolique de la courbe correspondante traduit un découplage entre l'anatomie et la géométrie.

Il est clair que dans ce dernier cas de figure, la conduite d'analyses basées sur les mesures L_c et/ou W_c peut générer des résultats difficilement interprétables voire incohérents. A titre d'exemple, le tableau 3 présente les relations d'allométrie ajustées sur l'ensemble de la phase larvaire de différentes espèces, allométrie de croissance (Tessier 1960) ou ontogénique (Röhrs, 1961, Gould, 1966). Le modèle d'ajustement est la régression fonctionnelle plus adaptée que la régression prédictive lorsque les deux variables sont aléatoires (Ricker, 1973; Sokal et Rohlf, 1981). *Pecten maximus*, *Patinopecten yessoensis*, *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* présentent une allométrie légèrement majorante en cohérence avec les résultats reportés dans la

littérature (Loosanoff *et al.*, 1966; Rose et Dix, 1984). Par contre, l'ajustement sur l'ensemble de la phase larvaire de *Crassostrea gigas* n'a aucun sens car les paramètres mesurés n'ont pas de correspondance anatomique stable dans le temps. Le résultat obtenu (isométrie) ne traduit que le découplage entre l'anatomie et la géométrie de la larve au cours de sa croissance.

A titre exploratoire, les coefficients des équations d'allométrie ont été introduits dans le calcul d'un indice théorique d'allongement moyen défini par la relation $I_{th} = b \overline{L_c}^{(\alpha-1)}$ dont les variations sont représentées sur la figure 7c. L'absence de corrélation entre les deux courbes caractérisant *Crassostrea gigas* confirme les conclusions précédentes. Une bonne corrélation est à l'inverse obtenue pour les autres espèces (tableau 4).

Espèce	Equation de la régression $y = \text{Log } W_C, x = \text{Log } L_C$ $z = \text{Log } A$	[α] 95% *	R ²	n
<i>Pecten maximus</i> (P1)	$y = 1,109 x - 0,734$ $z = 2,096 x - 0,911$	1,088-1,130 2,076-2,116	0,909 0,974	1093
<i>Pecten maximus</i> (P2)	$y = 1,148 x - 0,928$ $z = 2,130 x - 1,079$	1,121-1,175 2,104-2,156	0,884 0,966	886
<i>Pecten maximus</i> (P3)	$y = 1,152 x - 0,948$ $z = 2,132 x - 1,090$	1,125-1,178 2,107-2,158	0,878 0,964	1022
<i>Pecten maximus</i> (P4)	$y = 1,135 x - 0,861$ $z = 2,116 x - 1,010$	1,117-1,154 2,102-2,138	0,901 0,971	1569
Ensemble	$y = 1,129 x - 0,835$ $z = 2,116 x - 1,010$	1,119-1,140 2,106-2,126	0,909 0,974	4570
<i>Patinopecten yessoensis</i>	$y = 1,141 x - 0,879$ $z = 2,132 x - 1,075$	1,126-1,156 2,117-2,147	0,941 0,983	1386
<i>Ruditapes decussatus</i>	$y = 1,112 x - 0,723$ $z = 2,104 x - 0,925$	1,081-1,145 2,073-2,136	0,942 0,984	297
<i>Ruditapes philippinarum</i>	$y = 1,193 x - 1,132$ $z = 2,183 x - 1,322$	1,170-1,217 2,160-2,206	0,937 0,981	656
<i>Crassostrea gigas</i>	$y = 1,003 x - 0,170$ $z = 2,000 x - 0,399$	0,995-1,011 1,992-2,008	0,975 0,987	1573

Tableau 3. Régressions fonctionnelles entre les descripteurs géométriques : largeur, longueur et surface, longueur
* [α] 95% : Intervalle de confiance de α à 95%.
P1 = ponton n°1, etc.

Espèce	R	p
<i>Pecten maximus</i>	0,823	0,0021 **
<i>Patinopecten yessoensis</i>	0,952	<0,0001 ***
<i>Ruditapes decussatus</i>	0,959	0,0008 ***
<i>Ruditapes philippinarum</i>	0,981	<0,0001 ***
<i>Crassostrea gigas</i>	-0,220	0,5548 NS

Tableau 4. Corrélation entre les indices de forme observé et théorique pour différentes espèces

III.1.2. Validation.

Les conditions de la substitution méthodologique étant précisées, l'évaluation est complétée par un ensemble de tests de double mesures. Ils ont été réalisés sur quatre séries de trois élevages de *Pecten maximus* suivis régulièrement dans le temps : à chaque point de contrôle, deux échantillons aléatoires sont prélevés dans chaque bac d'élevage et mesurés l'un de manière classique, l'autre par analyse d'images. En fin d'élevage, on dispose pour chaque lot suivi de deux séries d'estimations des longueurs moyennes et des variances associées. Ces tests ont été réalisés sur des élevages conduits à des fins expérimentales étrangères à la présente problématique. Cette approche a pour avantage majeur la conservation des comportements habituels de mesure manuelle, riches en information.

Une analyse préliminaire des résultats permet de dégager un certain nombre de tendances:

- les courbes de croissance obtenues par chacune des méthodes présentent, de façon générale, une allure comparable. Par ailleurs, on observe pour tous les élevages et quelle que soit la méthode de mesure, une forte augmentation de la variabilité de la taille des véligères en fonction du temps, phénomène courant dans les élevages larvaires de bivalves (Le Pennec, 1978; Bayne 1965, 1983).
- Dans certains cas cependant, on constate une divergence entre les estimations des longueurs moyennes en fin d'élevage associée à une divergence dans les estimations des dispersions : les moyennes estimées à partir des données de mesure classique sont supérieures avec une dispersion moindre. Ce phénomène est observé notamment dans le cas d'élevages présentant un retard de croissance dans les stades jeunes (prodissoconque I).

La comparaison statistique des deux techniques de mesure est effectuée pour chaque série d'élevage par une analyse de covariance à deux facteurs (méthode et lot). L'hypothèse d'égalité des variances résiduelles est vérifiée par un test de Bartlett (Snedecor et Cochran, 1967).

Pour 3 des 4 séries, les interactions des premier et second ordres non significatives ont été supprimées du modèle. Le tableau 5 présente les résultats de ces analyses. Les données concernant l'interaction méthode-âge des modèles complets sont cependant reportées au bas du tableau 5.

Au seuil de confiance usuel de 5%, l'hypothèse nulle d'égalité des pentes des longueurs moyennes en fonction de l'âge estimées par les deux techniques, testée par l'interaction méthode-âge est acceptée pour les trois séries analysées. L'hypothèse nulle d'égalité des origines, testée par l'effet principal méthode est rejetée au seuil de 5%, acceptée au seuil

de 1%. L'analyse de covariance à un facteur, reconduite sur chaque lot (avec pour incidence une perte de puissance des tests), ne montre sur aucun d'eux d'effet significatif (au seuil de 5 %) de la technique de mesure sur les longueurs moyennes (pente et origine).

Les résultats relatifs à la quatrième série d'élevages montrent, tous lots confondus, des interactions très significatives entre le covariant (âge) et les effets méthode ($p < .001$) et lot ($p = .008$). Une analyse de covariance à un facteur est donc reconduite sur chacun des 3 lots concerné (tableau 6). Concernant le lot n°1, on observe que l'effet de la méthode sur l'estimation des longueurs moyennes varie selon l'âge, phénomène qui n'est pas retrouvé sur les deux autres lots pour lesquels on note cependant un manque d'ajustement des modèles.

Il convient de préciser que les trois premières séries répondent à des objectifs expérimentaux situés en aval de l'élevage larvaire : pontes et élevages sont réalisés en conditions standards. La quatrième série répond à des objectifs expérimentaux propres (méthodes d'analyse prédictive de la qualité de la ponte) avec pour résultante des élevages larvaires présentant des performances de croissance non nécessairement conformes aux potentialités de l'espèce.

Les résultats atypiques obtenus sur cette dernière série soulèvent le problème de l'échantillonnage : on peut suggérer que la méthode de mesure classique favorise le processus plus ou moins conscient de sélection des (gros) individus soumis à la mesure entraînant un biais dans l'échantillonnage. L'acquisition de données à partir d'images numériques garantie à ce titre une meilleure objectivité de la mesure : les individus ne devant pas être mesurés doivent être éliminés selon un processus actif. Généralement occulté, ce problème de l'échantillonnage mériterait d'être étudié plus en détail notamment par une vérification de la reproductibilité des résultats intra- et inter-opérateurs

Variation	Série I				Série II				Série III			
	SS	ddl	F	p	SS	ddl	F	p	SS	ddl	F	p
résiduelle	663.46	47			445.73	35			1745.13	43		
régression	47940.78	1	3396.18	.000	29972.34	1	1960.9	.000	25937.16	1	639.09	.000
méthode	98.92	1	7.01	.011	89.85	1	7.06	.012	293.04	1	7.22	.010
lot	100.09	2	3.55	.037	115.31	2	4.53	.018	161.68	2	1.99	.149
R2 ajusté	.986				.983				.934			

méthode * âge	9.38	1	.75	.391	22.24	1	1.62	.213	68.81	1	1.75	.195
---------------	------	---	-----	------	-------	---	------	------	-------	---	------	------

Tab. 5. Résultats des analyses de covariances à deux facteurs sur les 3 premières séries d'élevages.

La dernière ligne (interaction méthode-âge) est extraite des résultats obtenus avec un modèle complet.

Variation	Lot 1				Lot 2				Lot 2			
	SS	ddl	F	p	SS	ddl	F	p	SS	ddl	F	p
résiduelle	385.52	12			1504.84	13			1007.28	11		
régression	18541.71	1	577.15	.000	10030.97	1	86.66	.000	8319.92	1	90.86	.000
méthode	84.85	1	2.64	.130	129.73	1	1.12	.309	267.88	1	2.93	.115
méthode *age	576.06	1	17.93	.001								
R2 ajusté	.976				.851				.876			

Tab. 6. Analyses de covariances à un facteur sur chacun des lots de la quatrième série d'élevages.

III.2. Apport spécifique dans la qualité de la représentation de la croissance.

Outre les avantages mentionnés plus haut, la biométrie larvaire par analyse d'images est susceptible de permettre une amélioration de la représentation de la croissance :

- l'accès simultané à plusieurs descripteurs permet une approche multivariable de comparaison des performances de croissance dont l'intérêt est évident.
- la surface et le diamètre équivalent sont des attributs qui autorisent, au niveau intra spécifique, l'appréciation de la croissance sensu stricto, i.e. indépendamment des variations morphologiques individuelles et facilitent pour les mêmes raisons les comparaisons inter spécifiques.

Il est admis que la plupart des bivalves sont correctement représentés par la projection plane d'une de leurs valves (Ferson *et al.*, 1985; Schweitzer *et al.*, 1986). Dans ce cadre et en l'absence (actuelle!) de technologie susceptible d'appréhender en routine l'information tridimensionnelle d'objets individuels microscopiques, le choix de la surface (ou du diamètre équivalent) comme descripteur de la croissance préférentiellement à la longueur ou la largeur (hauteur) apparaît pertinent car il permet la représentation de la croissance en terme d'accroissement en taille indépendamment des transformations morphologiques associées.

A titre d'illustration, la figure 8 présente la transformation d'une ellipse O en une ellipse A exprimée en coordonnées cartésiennes, les grandeurs d_L et d_W correspondant respectivement à l'accroissement relatif du grand axe (longueur) et du petit axe (largeur). Un simple changement de repère permet de dissocier cette transformation en un accroissement en taille et un changement de forme (Bookstein *et al.*, 1985). Du fait de transformations morphologiques différentes, l'accroissement en taille des objets A et B (de même surface) ne sera pas correctement représenté par leur accroissement en largeur ou en longueur.

La représentation habituelle de la croissance par le suivi d'une dimension linéaire (longueur ou largeur) est en fait un expédient méthodologique communément accepté et justifié par l'existence d'une corrélation forte entre la variable d'intérêt effectif (e.g., volume, poids) et celle qui lui est substituée. L'insuffisance de ce critère a souvent été débattue (Smith 1980, Sweet 1980). Les larves de bivalves présentent une croissance allométrique entre la longueur et la largeur anatomiques. Les relations d'allométrie entre ces grandeurs sont variables d'une espèce à l'autre et ne sont pas nécessairement constante sur l'ensemble de la phase larvaire (Loosanoff *et al.*, 1966). On mesure alors l'intérêt de l'accessibilité à des descripteurs tels que la surface ou le diamètre équivalent.

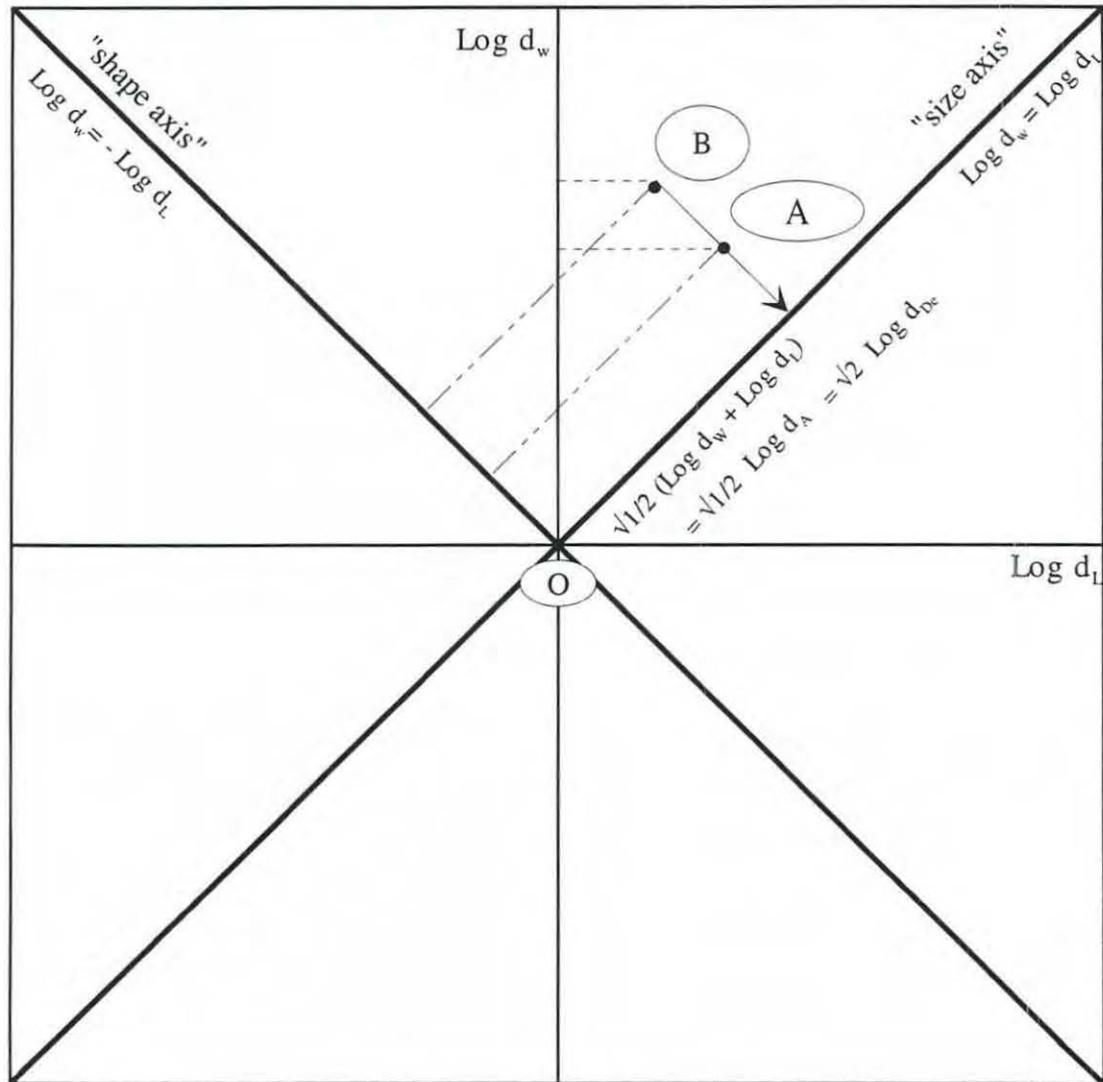


Fig. 8. Expression des variations de la taille et de la forme en coordonnées cartésiennes. La diagonale "size axis" correspond aux transformations invariantes pour la forme, la diagonale "shape axis" correspond aux transformations invariantes pour la taille. (modifié d'après Bookstein *et al.*, 1985).

III.3. Limites actuelles de la technique.

Dans sa configuration actuelle, le système, dédié à la mesure, présente un certain nombre de limitations qu'il convient de préciser. La validité des mesures repose sur une segmentation correcte de l'image déterminée par la qualité d'opérations telles que l'exposition et la focalisation, l'éventuelle séparation de larves connexes et l'élimination "d'artefacts" (e.g., larves mortes, débris organiques). Ces opérations relèvent pour partie au moins de la maîtrise de l'opérateur .

Par ailleurs, il convient de rappeler que l'information accessible porte sur la projection plane d'un objet tridimensionnel. Ceci peut d'une part entraîner les difficultés classiquement rencontrées pour la mesure des stades âgés d'espèces inéquivalves et/ou présentant un umbo proéminent (e.g., *Crassostrea gigas*). D'autre part, des paramètres intégrant l'épaisseur tels que la courbure de la prodissoconque (Salaün *et al.*, 1991) ne sont pas accessibles. Les relations entre ce type de paramètres et la surface mesurée mériteraient cependant d'être examinées.

IV. PERSPECTIVES ET CONCLUSION.

Le système SYBIOL est aujourd'hui opérationnel et utilisé en routine à l'écloserie expérimentale de mollusques d'Argenton (Robert, 1994).

L'intérêt majeur de ce type d'outil par rapport aux techniques classiques de mesure réside dans l'accessibilité à une information plus riche par l'extraction de paramètres tels que la surface ou le diamètre équivalent permettant une amélioration de la qualité de la représentation de la croissance. La définition de ces descripteurs ne présente aucune ambiguïté et la démarche algorithmique garantit la reproductibilité des mesures sur une image segmentée.

La longueur de la larve, classiquement utilisée dans les suivis de croissance, n'est par contre immédiatement accessible que pour les espèces qui présentent une orientation stable dans le temps de la plus grande dimension de la larve. Cette condition permet le maintien de la correspondance entre l'anatomie et la géométrie de la larve au cours de son développement. La nature des descripteurs longueur et largeur (hauteur) extraits sur les images numériques est en effet purement géométrique. L'extraction de ces paramètres chez les autres espèces exigerait le développement d'un algorithme plus complexe qui permette d'orienter la structure (e.g. reconnaissance de l'umbo). Les données de Loosanoff *et al.* (1966), permettent cependant d'établir que peu d'espèces sont concernées par ce problème parmi lesquelles néanmoins *Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica*.

Au delà du simple aspect de la mesure ce type d'outil présente des avantages certains à différents niveaux dont un gain de temps et une fiabilité accrue concernant le traitement entièrement automatisé des données et l'optimisation de l'archivage des résultats expérimentaux.

Il est clair que la configuration actuelle ne répond pas aux objectifs initiaux d'automatisation complète de la mesure et du comptage. Le maintien de ces objectifs supposera, en fait, la définition d'une configuration matérielle et logicielle plus adaptée.

Le comptage exhaustif d'un échantillon implique l'analyse de mosaïques d'images, ce qui génère des contraintes matérielles importantes : puissance de calcul accrue, platine motorisée en XYZ autorisant une focalisation automatique.

L'environnement de développement (logiciel d'analyse d'images et interface de programmation) doit permettre l'implémentation rapide d'algorithmes plus complexes que ceux actuellement retenus : détection d'objets connexes (comptage), reconnaissance des larves mortes (comptage et mesure), reconnaissance des artefacts et des larves incorrectement positionnées en particulier pour les stades larvaires âgés d'espèces inéquivalves (comptage et mesure). Les deux premiers points ne présentent pas de difficulté majeure : des algorithmes basés sur des opérateurs de morphologie mathématique (Serra, 1982, 1988; Coster et Chermant, 1985) ont été testés avec des résultats satisfaisants (Pontual, données non publiées). Le dernier point est en première approche plus difficile du fait d'une très forte variabilité des formes potentielles. Une description plus complète des larves et le recours à des méthodes de reconnaissance de forme (e.g., réseau de neurones) pourront être envisagés pour la constitution d'une base de données des critères de sélection plus complète que celle actuellement disponible. En tout état de cause, un algorithme performant n'est envisageable que sur des prélèvements d'une "qualité" optimale, fonction notamment de la densité des larves, de la "propreté" de l'échantillon et de la qualité du conservateur. Ces éléments conditionnent d'ailleurs largement le temps actuellement nécessaire à l'analyse.

On notera enfin que la forme d'un objet est quantifiable sur une image numérique. L'apport de ce type d'information non accessible jusqu'à présent mériterait probablement d'être évalué.

BIBLIOGRAPHIE.

- Anonyme. OptiLab (1.4). Graftek France 9, route de Verrières. 92360 Meudon La Forêt.
- Bayne B.L., 1965. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia* **2** : 1-47.
- Bayne B.L., 1983. The physiological ecology of marine molluscan larvae. *In*: Verdonk N.H., van der Biggelaar J.A.M. et Tompa A. (eds). *The Mollusca*, Vol. III. Academic Press, New York, 299-343.
- Bookstein F.L., Chernoff B., Elder R.L., Humphries J.M., Smith G.R. et Strauss R.E., 1985. Morphometrics in evolutionary Biology. The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, special publication 15. 277 p.
- Bourne N., Hodgson C.A., et Whyte J.N.C., 1989. A manual for scallop culture in British Columbia. Can. Tech. Report. Fish. Aquat. Sc., 1964. 215 p.
- Chanley P.E. et Andrews J.D. 1971. Aids for identification of bivalve larvae of *Crassostrea virginica*. *Malacologia* **11**(1):45-119.
- Coster M. et Chermant J.L., 1985. Précis d'analyse d'images. Editions du CNRS, Paris. 521 p.
- Cox L.R., 1969. General features of Bivalvia. *In*: *Treatise on Invertebrate Paleontology*, Part N, Mollusca 6, Bivalvia (R.C. Moore Ed.) pp: N21-N129, University of Kansas Press.
- Ferson S., Rholf F.J. et Koehn R.K., 1985. Measuring shape variation of two dimensional outlines. *Syst. Zool.* **34**(1) : 59-68.
- Gonzalez Jordan J.E., 1991. Analyse d'images biologiques : définition d'une interface homme-machine et automatisation de l'acquisition et du traitement d'images de larves de coquilles Saint Jacques. Stage de fin d'études ETSET de Barcelone / ENSTde Bretagne. 146 p.
- Gould S.J., 1966. Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **41**(4) : 587-640.
- Inoué S., 1986. Video microscopy. Plenum Press, New York and London. 584 p.

- Le Borgne Y., 1989. Reproduction contrôlée des mollusques bivalves. *In* : Lavoisier (ed.). Aquaculture, Vol. 1, 2nd edn. Technique et Documentation Lavoisier. Paris.
- Le Pennec M., 1978. Génèse de la coquille larvaire et postlarvaire chez divers bivalves marins. Thèse Doc. Etat. Fac. Sci. Brest. 229 p.
- Loosanoff V.L et Davis H.C., 1963. Rearing of bivalve mollusks. *In* : Advances in Marine Biology, Academic Press London ,Vol 1 (F.S. Russel Ed.): 1-136.
- Loosanoff V.L., Davis H.C. et Chanley P.E., 1966. Dimensions and shapes of larvae of some marine bivalve mollusks. *Malacologia*. **4**(2) : 351-435.
- Ricker W.E., 1973 . Linear regression in fishery research. *J. Fish. Res. Board Can.* **30** : 409-434.
- Robert R; 1994. Visite de trois écloséries industrielles de mollusques bivalves dans l'état de Whashington (E.U.) et en Colombie Britannique (Canada) : rôle et importance. *Equinoxe*. **50** : 19-31.
- Robert R., Miner P., Mazuret M. et Conan J.P.,1994. Eclosérie expérimentale de mollusques d'Argenton, bilan et perspectives. *Equinoxe* **49** : 20-33.
- Roegner C.G., 1988. Use of image analysis in determination of growth and mortality rates of newly settled *Crassostrea virginica*. *Annu. Meet. of the Natl. Shellfisheries Assoc, New Orleans, LA (USA), 26 Jun 1988, J. Shellfish. Res.* **7**(1), p. 190.
- Roegner G.C., 1991. Temporal analysis of the relationship between settlers and early recruits of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Exp. Mar. Biol Ecol.* **151**(1) : 57-69.
- Röhrs M., 1961. Allometrie forschung und biologische Formanalyse. *Z Morph. Anthropol.* **51** : 389-321.
- Rose R.A. et Dix T.G., 1984. Larval and juvenile development of the Doughboy scallop *Chlamys (Chlamys) asperrimus* (Lamarck) (Mollusca/ Pectinidae). *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* **35** : 315-323.
- Rosenfeld A. et Kak A.C., 1976. Digital picture processing. *Computer Sciences and applied mathematics*, Academic Press. 457 p.
- Rosenfeld A. et Kak A.C., 1982. Digital picture processing, volume 2.. *Computer Sciences and applied mathematics*, Academic Press. 349 p.
- Salaün M., Boucher J. et Le Pennec M., 1991. Prodissoconch shell characteristic as indicators of larval growth and viability in *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758). *Journal of shellfish Research* **10**(1) : 37-46.

- Schweitzer P.N., Kaesler R.L. et Lohmann G.P., 1986. Ontogeny and heterochrony in the ostracodes *Cavellina* Coryell from lower permian rocks in Kansas. *Paleobiology*, **12**(3) : 290-301.
- Serra J., 1982. Image analysis and mathematical morphology. Academic Press, London. 610 p.
- Serra J., 1988. Advances in mathematical morphology. Academic Press, London. 610 p.
- Smith R.J. 1980. Rethinking allometry. *J. theor Biol.* **87**: 97-111.
- Snedecor G.W. et Cochran W.G., 1967. Statistical methods, Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Sokal R.R. et Rohlf F.J., 1981 *Biometry*. W.H. Freeman and company. New York. 859 p.
- Sweet S.S., 1980. Allometric Inference in Morphology. *Amer. Zool.*, **20** : 643-652.
- Tessier G., 1960. Relative growth. **In**: *The physiology of Crustacea*, vol 1, pp 537-560. Th Waterman Ed. New York.