

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ BATNA 1 -BATNA-
INSTITUT DES SCIENCES VÉTÉRINAIRES
ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES



THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière

Sciences vétérinaires

Option

Anatomie vétérinaire

Présentée Par

ACHOURI Abdelhamid

THÈME

ÉTUDE MORPHOMÉTRIQUE, HISTOLOGIQUE ET
HISTOCHIMIQUE DES MUSCLES DU POULET DE
CHAIR

Jury :

Président : LAABASSI Farouk

Professeur - U. Batna 1

Examineur : DJENNANE Nacima

Professeur - U. Alger 1

Examineur : KHADRAOUI Hachani

Professeur - U. Batna 2

Examineur : TEKKOUK Faiza

Professeur - U. Constantine 1

Rapporteur : BENNOUNE Omar

Professeur - U. Batna 1

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2022-2023

DÉDICACE

Le travail de la présente thèse est le fruit d'un long chemin de patience et de persévérance. Il est dédié à :

La mémoire de mon père Allah yarhamhou

Ma mère

Ma femme

Mes enfants

Mes frères et sœurs

Abdelhamid ACHOURI

REMERCIEMENTS

Je tiens, tout d'abord, à remercier toute personne qui m'a aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail et en particulier pour mon directeur de thèse Pr. Omar BENNOUNE pour son soutien et ses conseils pour la finalisation de la présente thèse.

Un remerciement particulier à l'ensemble des membres du jury : Pr LAABASSI Farouk pour avoir accepté la présidence de notre jury de thèse, ainsi qu'à l'ensemble des examinateurs Pr DJENNANE Nacima, Pr KHADRAOUI Hachani et Pr TEKKOUK Faiza, qui nous ont honoré par leur présence et ont eu l'amabilité d'accepter d'être membres du jury et de participer à la lecture et à l'évaluation de la présente thèse.

Nous voudrions profondément remercier Christophe Praud et Cécile Berri (Unité de la Recherche Avicole-INRA France) pour leur aide dans la maîtrise des différentes colorations des tissus musculaires.

Merci du fond du cœur à Dr Saadeloud Monir pour son aide précieuse dans la réalisation d'une partie de mes travaux sur les hormones de croissance qui n'est pas incluse dans cette thèse. Un grand merci à Dr Rahab Hamza (Maitre de Recherche au Centre de Recherche de la Biotechnologie de Constantine) et Mihoubi Mohamed Aimene, Ingénieur de laboratoire en Biologie à l'Université de Batna 2 pour le stockage et la conservation de nos échantillons.

Nous remercions également Hachama Mohammed (Professeur en Mathématique, Département de Mathématique, Université Saad Dahleb, Blida 1), Anthony Sinadinos (Professeur en médecine moléculaire, Faculté de Pharmacie et des sciences Biomédicales, Université de Portsmouth, UK), Ida Erzen (Professeur en Neurosciences, Institut d'Anatomie, Université de Ljubljana, , Slovénie), Lucas Robert Smith (Assistant Professeur en Génie biomédical, Université de Californie, Davis, USA), Karyn Esser (Professeur en Physiologie, Université de Florida, Gainesville, USA) pour leurs aides et leurs directives.

Sans oublier notre remerciements à l'équipe de la clinique Youba Vet Clinic (Dr Benlahcene Monir et Mr Adouane Slimene) ainsi que les deux amis Dr Azizi Abdennour et Dr Belbedj Hamid pour leurs aides dans les préparations et les prélèvements des échantillons.

Abdelhamid ACHOURI

SOMMAIRE

DÉDICACE	I
REMERCIEMENTS	II
SOMMAIRE	III
TABLES DES ILLUSTRATIONS	VI
Liste des figures	VI
Liste des tableaux	IX
Liste des abréviations	X
INTRODUCTION	1
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. Rappels anatomiques des muscles étudiés	5
I.1 Définition du muscle	5
I.2 Rappels sur la musculature du poulet de chair	5
I.2.1 Au niveau du membre thoracique	5
I.2.2 Au niveau du membre pelvien	8
II. Mise en place et développement des muscles du poulet de chair	9
III. Classification des fibres musculaires	10
III.1 Classification des fibres musculaires selon leur activité contractile	10
III.2 Classification des fibres musculaires selon leur métabolisme énergétique	11
III.3 Détermination des différents types de fibres musculaires chez le poulet	13
IV. Variabilité inter et intra musculaire	14
IV.1 Variabilité inter musculaire	14
IV.2 Variabilité intra musculaire	15
V. Mesure des paramètres morphométriques des fibres musculaires	17
V.1 Nombre total des fibres musculaires (nbFT) d'un muscle	17
V.1.1 Techniques utilisées pour calculer le nombre total des fibres musculaires (nbFT)	17
V.1.2 Facteurs qui influencent le nombre total des fibres musculaires (nbTF) par muscle	18
V.2 Aire de Section Transversale (AST)	22
V.2.1 Techniques de mesure de l'Aire de Section Transversale (AST)	23
V.2.2 Facteurs qui influencent l'aire de section transversale (AST)	24
VI. Diamètre Moyen de Féret (DMF)	30
VI.1 Facteurs qui influencent le diamètre moyen de Feret (DMF) des fibres musculaires	32
VI.1.1 Morphologie du muscle	32
VI.1.2 Espèce	35
VI.1.3 Race et sélection génétique	35
VI.1.4 Sexe	36
VI.1.5 Age	36
VI.1.6 Etat de santé	36
VI.2 Relation entre le diamètre moyen de Feret (DMF) et le nombre total des fibres musculaires (nbFT)	37
VII. Coefficient de variabilité	39
VIII. Périmètre	39
IX. Relation entre les caractéristiques de la fibre musculaire et la qualité de la viande	39
X. Traitement d'image du tissu musculaire	40
X.1 Acquisition des images	40

X.2	La segmentation	41
X.2.1	Logiciels semi-automatiques	41
X.2.2	Logiciels automatiques spécialisés	42
X.3	Mise en évidence des différents types de fibres musculaires	43
MATÉRIEL ET MÉTHODES		45
I.	ÉTUDE morphométrique	45
I.1	Matériel	45
I.1.1	Les animaux	45
I.1.2	Instruments	45
I.2	Méthodes	46
I.2.1	Préparation des muscles à la dissection	46
II.	ÉTUDE histologique et histochimique des muscles étudiés	46
II.1	Prélèvement des échantillons	46
II.1.1	Matériel	46
II.1.2	Calcul du poids vif et du taux de croissance	47
II.1.3	Isolement et stockage des fragments destinés à l'étude histologique	47
II.2	Réalisation des coupes histologiques et préparation des lames	49
II.3	Techniques de coloration	49
II.3.1	Coloration à l'azorubine	49
II.3.2	Coloration histochimique	49
II.4	Prise et traitement d'images	50
II.4.1	Acquisition d'image	50
II.4.2	Segmentation	53
II.4.3	Typologie :	54
III.	ÉTUDE comparative entre trois logiciels de traitement d'image (2 semi-automatique et 1 automatique)	56
III.1	Acquisition des images	56
III.2	Segmentation	57
III.2.1	Étapes de segmentation par Image Pro Plus 10 (IP)	58
III.2.2	Étapes de segmentation par le logiciel Fiji	58
III.3	Post traitement des images segmentées par Fiji	59
IV.	Étude statistique	60
RÉSULTATS		63
I.	ÉTUDE histologique et histochimique des muscles étudiés	63
I.1	Évolution du poids vif des poulets pour chaque âge d'étude	63
I.2	Étude des paramètres morphométriques des fibres musculaires pour chaque muscle étudié	64
I.2.1	Calcul du nombre total des fibres dans le muscle antérieur latissimus dorsi (ALD)	64
I.2.2	Comptage de l'aire de section transversale (AST) des fibres musculaires des trois muscles	64
I.2.3	Calcul du diamètre moyen de Feret (DMF) des fibres musculaires des trois muscles de l'étude	68
I.3	Pourcentage de différents types de fibres dans les trois muscles	73
I.3.1	Pectoral Superficiel (Ps)	73
I.3.2	Antérieur Latissimus Dorsi (ALD)	73
I.3.3	Sartorius M (Sart M)	74
I.3.4	Sartorius Rapide (Sart R)	74
I.4	Répartition et distribution des différents types de fibres au sein des faisceaux musculaires	75

I.4.1	Pectoral Superficiel (Ps)	75
I.4.2	Antérieur Latissimus Dorsi (ALD)	76
I.4.3	Sartorius (Sart)	78
II.	ÉTUDE comparative entre trois logiciels de traitement d'image (2 semi-automatiques et 1 automatique)	81
II.1	Comparaison entre le scanner et le microscope concernant l'acquisition des images (Figure 33)	81
II.1.1	Scanner des diapositives	81
II.1.2	Le microscope	81
II.2	Comparaison entre trois logiciels (Cytinformatics, Fiji et Image Pro Plus 10) concernant la segmentation	83
II.2.1	Première étape de la segmentation (individualisation des fibres)	83
II.2.2	Deuxième étape (post traitement des images segmentées)	84
II.2.3	Du point de vue du calcul des paramètres des fibres musculaires	86
	DISCUSSION	93
I.	ÉTUDE histologique et histochimique des muscles étudiés	93
I.1	Calcul du poids vif des poulets et le poids des muscles concernés pour chaque âge d'étude	93
I.2	Etude des paramètres morphométriques des fibres musculaires pour chaque muscle étudié	93
I.2.1	Nombre total des fibres musculaires (nbFT)	93
I.2.2	Comptage de l'Aire de Section Transversale (AST)	96
I.2.3	Calcul de Diamètre Moyen de Feret (DMF)	100
I.2.4	Coefficient de variabilité :	101
I.3	Pourcentage de différents types de fibres dans les trois muscles :	102
I.3.1	Pectoral Superficiel (Ps)	102
I.3.2	Antérieur Latissimus Dorsi (ALD)	102
I.3.3	Sartorius Mixte (Sart M)	103
I.3.4	Sartorius Rapide (Sart R)	104
I.4	Répartition et distribution des différents types de fibres au sein des muscles et des faisceaux musculaires	104
I.4.1	Pectoral Superficiel (Ps)	104
I.4.2	Antérieur Latissimus Dorsi (ALD)	105
I.4.3	Sartorius (Sart)	105
II.	ÉTUDE comparative entre trois logiciels de traitement d'image (2 semi-automatiques et 1 automatique)	108
II.1	Acquisition d'image :	108
II.2	Temps nécessaire à la comparaison de segmentation entre les 3 logiciels (Cytinformatics LLC « CytoF », Fiji « FDP, FM » et Image Pro Plus 10 « IP ») :	109
II.2.1	Temps nécessaire à la segmentation et le nombre de fibres obtenues :	109
II.2.2	Temps nécessaire au post-traitement des images segmentées :	111
II.3	Comparaison des paramètres des fibres musculaires obtenus après segmentation avec les trois logiciels :	112
II.4	Typologie des fibres :	114
	CONCLUSION	115
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	120
	PUBLICATION	135
	RÉSUMÉ	152

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1: Origine et insertion des muscles pectoraux superficiel et profond (Achouri, 2008)	6
Figure 2: Muscles pectoraux du <i>Cygnus cygnus</i> (Matsuoka & Hasegawa, 2007).....	7
Figure 3: Définition des DMF et DMaxF selon Hosdez (2017).....	31
Figure 4: Schéma montrant l'importance de mesurer le petit diamètre de chaque fibre.....	32
Figure 5: Types fondamentaux d'architecture interne dans les muscles squelettiques (Bruce & Carlson, 2019).	34
Figure 6: Architecture fonctionnelle des muscles fléchisseurs (ischio-jambiers) par rapport aux muscles extenseurs (quadrilatères) de la cuisse humaine (Bruce & Carlson, 2019).	34
Figure 7: Endroit de prélèvement du fragment (rectangle blanc) destiné à l'étude histochimique pour le muscle pectoral superficiel (Ps) selon la technique décrite par Scheuermann et al. (2004).	47
Figure 8: Endroit de prélèvement du fragment destiné à l'étude histochimique pour le muscle antérieur latissimus dorsi (ALD) qui est dans la demi-longueur du muscle (Image personnelle).....	48
Figure 9: Endroit de prélèvement du fragment destiné à l'étude histochimique pour le muscle Sartorius (Sart) (Image personnelle).....	48
Figure 10: A- Sélection d'une image d'Azorubine à partir d'une lame virtuelle du muscle Ps d'un poulet âgé de 49 jours scannée par le groupe Cytoinformatics LLC au format Aperio-SVS. B : c'est la partie encadrée dans l'image A après extraction par Aperio ImageScope.....	51
Figure 11: Sélection des images sériées à partir des lames virtuelles du muscle Sart d'un poulet âgé de 42 jours (partie mixte) scannées par le groupe Cytoinformatics LLC au format Aperio-SVS. A. coupe colorée à l'azorubine, B. coupe révélant l'activité SDH, C. coupe révélant l'activité ATPasique.	51
Figure 12: Une coupe sériée de la partie mixte du muscle Sart après extraction à partir des lames virtuelles (Figure 11). A. coupe colorée à l'azorubine, B. coupe révélant l'activité de la SDH, C. coupe révélant l'activité ATPasique.....	52
Figure 13: Sélection d'une image sériée à partir des lames virtuelles scannées du muscle ALD pour un poulet âgé de 49 jours par le groupe Cytoinformatics LLC au format Aperio-SVS. A. lame colorée à l'azorubine, B. lame révélant l'activité ATPasique.....	52
Figure 14: Une coupe sériée du muscle ALD au format JPEG après extraction à partir des lames virtuelles (Figure 13). A. coupe colorée à l'azorubine, B. coupe révélant l'activité ATPasique.....	53

Figure 15: B1, B2 et B3 : Segmentation des images d'Azorubine (A1, A2 et A3) pour les muscles Ps, ALD et Sart M sélectionnées dans les Figures 10, 14 et 12 respectivement par le groupe Cytoinformatics LLC (B). C1, C2 et C3 : post-traitement des images B1, B2 et B3 par le logiciel ImageJ (Fiji) pour supprimer des éventuels artefacts, des tissus non pertinents et/ou des cellules musculaires juxtaposées.	54
Figure 16: Sélection des fibres de type I sur l'image de référence (Figure 15, C3) à partir de l'image qui révèle l'activité ATPasique (B) puis les fibres de type IIA et IIB à partir de l'image qui révèle l'activité de l'enzyme SDH (A).....	55
Figure 17: Sélection des différents types de fibres IIIA (orange), IIIB (noir) et IIA (bleue) sur l'image de référence (Figure 15, C2) à partir de l'image qui révèle l'activité ATPasique (A).	55
Figure 18: Calcul du nombre des fibres musculaires du muscle ALD d'un poulet âgé de 42 jours capturée par un grossissement x25 par l'application CellCounter du logiciel Fiji (photo personnelle).	56
Figure 19: Images du muscle ALD d'un poulet âgé de 35 jours capturée par un microscope Optika grossissements x10 (A), x20(B), x25 (C), x40 et (D). E : Image scannée par Cytoinformatics LLC.	57
Figure 20: A- Image d'un muscle du poulet de chair âgé de 56 jours ouverte avec le logiciel de scanner des lames (fenêtre du logiciel Aperio ImageScope v12.3.2.8013 de Leica). B- Même image ouverte par le logiciel Fiji (fenêtre du logiciel Fiji). C- Même image ouverte par le logiciel Image Pro Plus 10 (fenêtre du logiciel Image Pro Plus 10).	57
Figure 21: A- Image d'un muscle ALD d'un poulet âgé de 14 jours colorée par Azorubine. B- Segmentation automatique faite après l'utilisation d'un filtre de variance au canal vert afin d'améliorer les contours des fibres musculaires, les flèches noires indiquent des zones non segmentées. C- Segmentation manuelle faite par l'utilisation d'un stylo numériseur qui laisse des stries violettes. D- Quand la segmentation manuelle a été terminée et pour ignorer les objets extracellulaires, une plage de taille excluant les artefacts du tissu conjonctif a été appliquée et une nouvelle segmentation été pratiquée pour obtenir une image bien segmentée.	58
Figure 22: A- Image d'un muscle ALD d'un poulet âgé de 14 jours colorée par Azorubine, B- L'application d'un seuillage sur l'image de référence, C- une image a été obtenue après l'étape de seuillage avec un nombre important de fibres musculaires qui n'ont pas été segmentées. D- La segmentation a été faite manuellement mais avec deux techniques, l'une par l'utilisation d'un stylo numériseur interfacé à un ordinateur et l'autre avec la souris d'un ordinateur, l'élimination des artefacts et des tissus non pertinents ont été réalisées par l'outil Drawing Tools pour les deux techniques de segmentation.	59
Figure 23: Post-traitement d'une image segmentée par les 3 logiciels (Fiji « FDP, FM », CytoF et IP) par Fiji. Les quatre images de la colonne (D) sont des agrandissements des lieux encadrés au hasard dans la colonne (C), le logiciel CytoF étant celui qui comptait le plus de fibres (cercles en bleu).	60
Figure 24: Évolution de la typologie du muscle ALD avec l'âge.	73
Figure 25: Évolution de la typologie du muscle Sart M avec l'âge.	74

Figure 26: Évolution de la typologie du muscle Sart R avec l'âge.....	75
Figure 27: Coupe transversale du muscle Ps d'un poulet de 42 jours.....	76
Figure 28: Typologie du muscle ALD d'un poulet d'un poulet âgé de 14 jours. Les fibres IIIB en noir et les fibres IIIA en orange.....	76
Figure 29: Images complètes du muscle ALD révélant l'activité ATPasique (J0, J7, J14, J21, J28, J35, J42, J49 et J56). L : latéral, M : médial, cr : crânial, ca : caudal.....	77
Figure 30: Typologie du muscle ALD d'un poulet âgé de 35 jours, les fibres IIIB en noire, IIIA en grise et les fibres IIA en blanche concentrées dans la partie médio caudale du muscle. L : latéral, M : médial, cr : crânial, ca : caudal.....	78
Figure 31: Images sériées d'une coupe transversale partielle du muscle Sart d'un poulet âgé de 42 jours, la flèche noire indique la partie médiale du muscle qui est mixte, la flèche rouge indique la partie latérale qui est rapide et la flèche verte indique la partie intermédiaire du muscle Sart.....	79
Figure 32: Sélection des différents types de fibres sur une image du muscle Sart (partie mixte) d'un poulet âgé de 42 jours, les fibres I (SO) = les fibres noires, les fibres IIA (FOG) = les fibres bleues, les fibres IIB (FG) = les fibres orange.....	80
Figure 33: Comparaison des valeurs du nombre moyen des fibres musculaires dans 9 images acquises avec les grossissements x100, x200, x250, x400 du microscope avec celles dans des images scannées par un scanner des lames de marque Leica et segmentées par Cytoinformatics LLC aux différents âges d'étude (NB : la prise des images a été réalisée dans les mêmes endroits).....	82
Figure 34: Le temps nécessaire pour la segmentation des 9 images par les deux logiciels Fiji (FDP, FM) et Image Pro Plus 10 (IP).....	84
Figure 35: Le temps nécessaire (heures : minute : seconde) pour le post traitement avec Fiji des 9 images segmentées par Fiji (stylo numériseur, souris), Image Pro Plus 10 (IP) et Cytoinformatics LLC pour obtenir des images bien segmentées sans fibres touchantes et sans artefacts.....	86
Figure 36: Nombre de fibres obtenues après segmentation avec les trois logiciels.....	87
Figure 37: Surface moyenne des fibres musculaires (μm^2) calculée par Fiji après segmentation par les trois logiciels.....	88
Figure 38: Périmètre moyen (μm) calculé par Fiji après segmentation par les trois logiciels.....	89
Figure 39: Diamètre moyen de Feret (DMF) moyen (μm) calculé par Fiji après segmentation par les trois logiciels.....	90
Figure 40: Coupe transversale d'un muscle enrobé de plastique (en bas à gauche). Le bloc spécimen a été ensuite tourné de 90° pour donner la coupe longitudinale (en haut à droite) des mêmes fibres (1 à 17). x 175. Barre = 100 μm	95
Figure 41: Image du muscle ALD d'un poulet âgé de 42 jours segmentée par IP montre les artefacts et les tissus non pertinents en rouge. Error! Bookmark not defined.	
Figure 42: Image segmentée par IP, les flèches rouges indiquent les petites marges faisant partie des fibres et qui sont négligées lors de la segmentation par le logiciel.....	114

Liste des tableaux

Tableau 1: Nomenclature des fibres musculaires chez les oiseaux (Berri & Duclos, 2003)	12
Tableau 2: Valeurs moyennes des poids des poulets et des muscles, AST des fibres des muscles (Ps, ALD et Sart) citées dans la bibliographie	28
Tableau 3: Valeurs moyennes des poids des poulets et des muscles, DMF des fibres des muscles (Ps, ALD et Sart) cités dans la bibliographie.....	38
Tableau 4: Composition de l'aliment destiné aux animaux pendant la période d'élevage.	45
Tableau 5: Évolution du poids vif moyen et le taux de croissance des poulets de l'étude en fonction de l'âge.....	63
Tableau 6: Évolution du nombre total des fibres musculaires du muscle ALD en fonction de l'âge.....	64
Tableau 7: Aire de section transversale (AST) des différents types de fibres des trois muscles étudiés.....	66
Tableau 8: Moyennes des aires de section transversale (AST) des fibres dans différentes classes d'âge pour chaque type de fibre étudié.	68
Tableau 9: Diamètre moyen de Feret (DMF) des différents types de fibres des trois muscles étudiés.....	70
Tableau 10: Moyennes des diamètres moyens de Feret (DMF) dans différents âges étudiés pour chaque type de fibre étudié.....	72
Tableau 11: Multiples comparaisons du nombre des fibres musculaires entre le scanner des diapositives et les différents grossissements microscopiques (Gx10, Gx20, Gx25 et Gx40) à différents âges de croissance de poulet de chair.....	82
Tableau 12: Nombre total des fibres après segmentation, le temps requis pour l'individualisation des fibres et l'évolution du temps nécessaire pour le post traitement des images en fonction de l'âge par l'utilisation de 3 logiciels (Fiji « FDP, FM », IP et CytoF).....	85
Tableau 13: Multiples comparaisons à différents stades d'âge pour les morphométries des fibres (AST, périmètre, DMF) entre les images segmentées FDP, FM, CytoF et IP (n = 63).	91

Liste des abréviations

ALD : Antérieur Latissimus dorsi
AST : Aire de section transversale
CytoF : Cytoinformatics LLC
DMF : Diamètre minimal de Feret
FDP : Fiji stylo numériseur
FG : Fibres Glycolytiques
FM : Fiji souris
FOG : Fibres Oxydo-Glycolitiques
G : Grossissement
H&E : Hématoxyline et éosine
IP : Image Pro Plus 10
MFN : Nombre total apparent de myofibres
NbFT : Nombre total de fibres
Ps : Pectoral superficiel
Sart : Sartorius
Sart M : Sartorius mixte
Sart R : Sartorius rapide
SO : Slow Oxydative

INTRODUCTION

La recherche sur le muscle squelettique est un domaine vaste et très compliqué ; les évaluations structurelle et fonctionnelle de ce tissu, quantitativement et qualitativement important, restent difficiles. De ce fait, beaucoup de maladies musculaires demeurent une énigme, tout en inquiétant les scientifiques et laissant leurs victimes souffrir longtemps. En biologie musculaire, le déterminisme des caractéristiques morphologiques (nombre, aire de section transversale (AST), diamètre moyen de Ferret (DMF), périmètre) et physiologiques (type contractile et métabolique) des fibres musculaires constitue le moyen le plus important pour étudier ces maladies et aussi pour apprécier la qualité de la viande des animaux de boucherie.

Beaucoup de recherches ont été faites sur les muscles du poulet de chair, principalement sur trois muscles dont la typologie est différente : le Pectoral superficiel ou major (Ps), le Sartorius (Sart) et le muscle Antérieur Latissimus Dorsi (ALD). Mais en raison de la difficulté du traitement d'image du tissu musculaire, la plupart de ces travaux ont été réalisés en minimisant le nombre de fibres à analyser (Shafiq et al., 1971 ; Smith et Fletcher, 1988 ; Papinaho et al., 1996), le nombre de répétitions (Kim et al., 2007), le nombre d'âges étudiés (Scheuermann et al., 2004 ; Verdiglione et Cassandro, 2013) ou le nombre de champs à analyser (Kim et al., 2007 ; Verdiglione et Cassandro, 2013 ; Koomkrong et al., 2015), ou encore en utilisant des forts grossissements qui ne permettent pas de visualiser un nombre acceptable de fibres (Donley, 2011). Bien que certains travaux n'aient pas mentionné tous les détails cités précédemment concernant le traitement d'image (McLennan, 1983 ; Edman et al., 1988 ; Barbara et al., 1989 ; Papinaho et al., 1996 ; Brandstetter et al., 1997), le point du traitement d'image a été bien expliqué dans les travaux d'Achouri et al. (2021).

Pour la plupart des recherches qui portent sur le muscle squelettique et qui se basent essentiellement sur le traitement de ses images histologiques et histochimiques, la taille de la fibre reste le critère étudié le plus important, mais, malheureusement, la manière dont cette grandeur est quantifiée varie considérablement (Meng et al., 2014). Depuis quelques décennies, le traitement des images histologiques s'est considérablement développé ; il s'agit d'un domaine très vaste qui englobe l'ensemble des méthodes et techniques opérant sur celles-ci, afin de rendre cette opération possible, plus simple, plus efficace et plus agréable, d'améliorer l'aspect visuel de l'image et d'en extraire des informations jugées pertinentes. Pour atteindre ces buts, un bon traitement de l'image du tissu musculaire pourrait ainsi être obtenu par trois

principaux déterminants : une meilleure acquisition de l'image, une parfaite segmentation et une adéquate mise en évidence des différents types de fibres musculaires

Pour l'acquisition de l'image histologique du muscle, les différents grossissements habituels ont été appliqués par les scientifiques mais d'une manière variable ; les grossissements x10 (Meunier et al., 2010 ; Wicke et al., 2007 ; Markus et al., 2014), x5 (Sertel et al., 2011) et x4 (Garton et al., 2010) ont été moins utilisés par rapport au grossissement x20 (Liu et al. 2013 ; Kim et al., 2007). Néanmoins, les chercheurs n'arrivent pas à capturer toute la surface d'une coupe colorée, qui peut être elle-même la surface totale d'un muscle, avec une seule capture d'image. Cela a obligé certains d'entre eux, comme Garton et al. (2010), à prendre plusieurs images de faible grossissement (x4) couvrant toute la surface du muscle, puis à les assembler pour former un montage d'une image complète à l'aide du logiciel Adobe Photoshop. De plus, il existe, dans certains muscles, une variabilité régionale considérable concernant la taille et le type des fibres, de sorte que la mesure ou l'échantillonnage de seulement quelques petites zones ne fournit pas nécessairement des mesures représentatives (Liu et al., 2013).

Au cours des dernières années, les chercheurs en bioinformatique ont réussi à développer des scanners de diapositives qui numérisent les lames contenant des coupes colorées par des réactions histoenzymologiques (Ameisen et al., 2012 ; Kummel et al., 2012). Selon le site Réflexions (site de vulgarisation de l'Université de Liège, 2014), cela devrait reléguer le microscope au placard, et la microscopie classique sera oubliée par les prochaines générations.

Comme son acquisition, la segmentation de l'image histologique musculaire en fibres distinctes n'est pas facile et les techniques simples de seuillage ou de morphologie ont une grande difficulté à séparer, avec précision, les fibres étroitement apposées (Dryden et al., 2006 ; Garton et al., 2010 ; Liu et al., 2013). Ces techniques qui sont, en général, des méthodes manuelles utilisées depuis 40 à 50 ans comprennent le traçage manuel des cellules ou l'utilisation d'un outil d'édition d'image à usage général (Janssens et al., 2013 ; Kostrominova et al., 2013) ; elles sont donc, selon Lei et al. (2019), extrêmement longues, coûteuses et contiennent de grandes variations entre observateurs.

Pour surmonter ces limitations, les chercheurs font appel à des méthodes semi-automatiques telles que Fiji (Schneider et al., 2012), Image Pro Plus 10 de « Media Cybernetics », Metamorph de « Universal Imaging Corporation », ainsi que des méthodes spécialisées comme Racin (Buche et al., 1997 ; Klemencic et al., 1998 ; Karen et al., 2009 ; Wang, 2016). Bien que largement utilisés, ces outils nécessitent toujours un prétraitement ; l'opérateur doit interagir manuellement avec l'ordinateur, utilisant un stylet numériseur ou une souris

d'ordinateur, pour éliminer les artefacts et les tissus non pertinents, et pour tracer les contours des fibres musculaires non segmentées (Mayachitra, 2006). Cette interaction rend l'analyse d'un grand nombre d'images fastidieuse et peu pratique (Janssens et al., 2013). En parallèle, le développement de méthodes entièrement automatiques progresse (Dryden et al., 2006 ; Brox et al., 2006 ; Kim et al., 2007 ; Sertel et al., 2011 ; Janssens et al., 2013 ; Liu et al., 2013 ; Strange et al., 2014 ; Sapkota et al., 2015 ; Lei et al., 2019). Ces techniques sont plus efficaces car elles exploitent les frontières entre les fibres musculaires de manière précise, fournissant ainsi des informations plus discriminantes. Cependant, elles présentent encore des inconvénients : elles sont souvent coûteuses, leur disponibilité peut être limitée, et plusieurs de ces programmes utilisent des raccourcis (par exemple, en supposant que les fibres sont des cercles ou des ellipses), ce qui peut rendre les mesures automatisées moins précises (Meng et al., 2014).

Les méthodes de typage des fibres musculaires ont été développées par les chercheurs en biomédical et les ingénieurs des logiciels. Initialement, la méthode de spectro-photo-microscopie a été utilisée pour mesurer la densité optique des fibres (Bye et al., 1989). Par la suite, des outils interactifs ont été introduits, utilisant des caméras vidéo CCD en mode vidéo en direct branchées au microscope pour classer les fibres selon les niveaux de gris des cellules musculaires (Buche & Mauron, 1996). Plus récemment, il y a eu l'émergence d'outils automatiques qui classent les fibres en superposant différentes coupes sériées colorées sur une image de référence (Kostrominova et al., 2013), en utilisant des logiciels qui déterminent la densitométrie des fibres, comme ceux utilisés par Meunier et al. (2010). Notons que ces derniers rencontrent des difficultés dans la classification de toutes les cellules musculaires, surtout dans les coupes où les fibres musculaires ne sont pas parallèles entre elles, changent de forme à travers une grande série de sections, ou si certaines fibres disparaissent de la section ou se divisent. Ces cas sont bien documentés dans notre travail et sont corroborés par les travaux de Karen et al. (2009).

Notre étude est divisée en deux parties distinctes. La première partie vise à mettre en évidence les différents paramètres morphométriques des fibres musculaires pour chaque muscle étudié avec l'âge (nombre, AST, DMF et coefficient de variabilité), ainsi que le pourcentage des différents types de fibres et leur distribution spatiale au sein des muscles et des faisceaux musculaires. Nous utilisons les nouvelles approches de traitement d'image pour analyser toute la surface des muscles ALD et Sart, ainsi qu'une partie du muscle Ps, en réalisant dix répétitions pour chaque âge étudié. La deuxième partie de notre étude vise à contribuer au bon traitement de l'image histologique du tissu musculaire squelettique et à éclairer le chemin pour les

chercheurs intéressés. Nous avons réalisé une comparaison en deux axes : tout d'abord, le traitement des images histoenzymologiques classiques du tissu musculaire en termes d'acquisition d'image par microscopie optique et scanner de diapositives. Ensuite, une comparaison de la segmentation à l'aide de trois logiciels : deux semi-automatiques (Fiji et Image Pro Plus 10) et un automatique (Cytoinformatics LLC). Enfin, nous expliquons la méthode de mise en évidence de la typologie des fibres musculaires basée sur des images colorées en Azorubine, segmentées par Cytoinformatics LLC, qui sont ensuite utilisées comme référence par Fiji pour la sélection manuelle des différents types de fibres, en exploitant des images révélant les colorations SDH et ATPasique.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. RAPPELS ANATOMIQUES DES MUSCLES ETUDIÉS

I.1 Définition du muscle

Le système musculaire est constitué de masses charnues, chacune limitée par une enveloppe fibreuse appelée aponévrose. Ces masses charnues, appelées muscles, sont formées de filaments adjacents, qui peuvent à leur tour se décomposer en fibres très fines alignées côte à côte ; les filaments décomposables en fibres forment des faisceaux musculaires, et l'unité fondamentale est la fibre musculaire. Les muscles sont attachés aux os chez les animaux vertébrés dotés d'une colonne vertébrale et d'un squelette, ou sous la peau chez les animaux non vertébrés. La masse musculaire constitue ce que l'on appelle communément la chair (source : www.cosmovisions.com/muscle.htm).

Le muscle squelettique a pour fonction principale la transformation de produits chimiques en énergie mécanique permettant la production de force pour la contraction et le maintien de la posture. De plus, les muscles squelettiques contribuent au métabolisme énergétique de base, à la thermorégulation et au stockage de substrats comme les glucides et les acides aminés. Toutes ces actions musculaires utilisent l'ATP qui est produit par trois voies énergétiques de base connues au cœur de la fibre musculaire (Picard et Gagaoua., 2020).

I.2 Rappels sur la musculature du poulet de chair

Le poulet de chair à croissance rapide, comme tous les oiseaux, se caractérise par une puissance musculaire presque entièrement localisée dans les membres thoracique et pelvien. Cette disposition résulte de la spécialisation de l'animal (Chatelain, 1986) ; nous allons décrire ci-après trois muscles de ces deux régions anatomiques chez cette espèce.

I.2.1 Au niveau du membre thoracique

I.2.1.1 Le muscle pectoral superficiel (Ps)

La forme de la charpente osseuse supportant le membre thoracique résulte du rôle prépondérant du muscle pectoral superficiel (Ps), abaisseurs de l'aile (Chatelain, 1986). L'origine du Ps sur la clavicule et le sternum est directe et ferme, tandis que l'attache sur la cage

thoracique est faible et non directe sur les côtes mais à partir de la surface des muscles sous-jacents (Figure 1).

Ce gros muscle peut être subdivisé en trois couches, qui se superposent crânialement. Ces trois couches proviennent de zones différentes : I provenant de la partie la moins profonde de la clavicule uniquement, II de la partie la plus profonde de la clavicule et de la carène du sternum, et III du plan sternal et de la cage thoracique. Il était presque impossible de séparer I et II, tandis que la partie la plus profonde de III pouvait facilement être décollée de la surface dorsale de II (Figure 2). Tous les composants fusionnent distalement et s'insèrent sur la surface crâniale de *Crista pectoralis* ou crête deltoïde à l'extrémité proximale de l'humérus (Chatelain., 1986 ; Mastuoka & Hasegawa, 2007) et il étend et stabilise le poignet lors des différentes phases du vol battu (Dial, 1992).

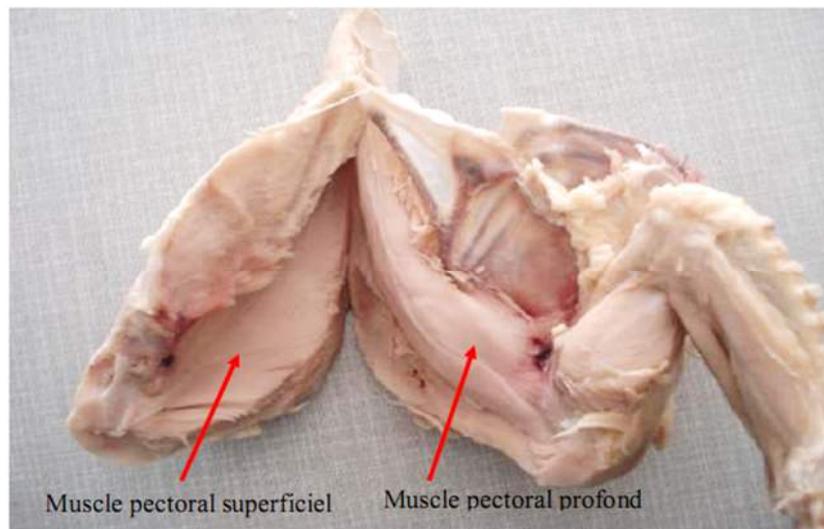


Figure 1: Origine et insertion des muscles pectoraux superficiel et profond (Achouri, 2008)

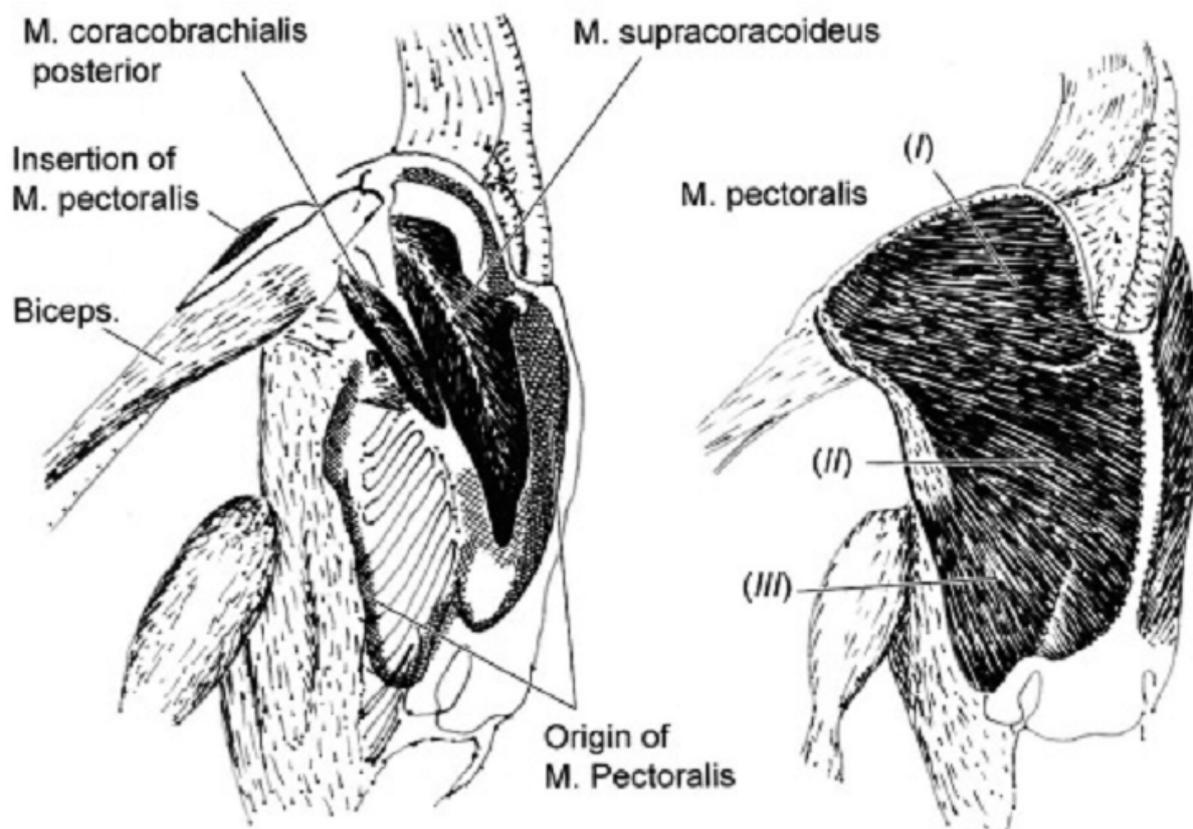


Figure 2: Muscles pectoraux du *Cygnus cygnus* (Matsuoka & Hasegawa, 2007)

Il est bien connu que les muscles peuvent être fonctionnellement subdivisés en régions ou compartiments ayant des fonctions spécifiques (English & Letbetter, 1982). Par exemple, le pectoral aviaire a deux régions primaires avec des innervations discrètes, des orientations de fascicules et des modèles de recrutement (Dial et al., 1988), et il a été démontré qu'il possède des sous-régions supplémentaires avec des innervations distinctes (Boggs & Dial, 1993).

I.2.1.2 Le muscle antérieur Latissimus dorsi (ALD) ou Grand Dorsal :

Le muscle ALD est le plus superficiel du dos, visible comme un muscle blanc sur le dos de l'oiseau (Matsuoka & Hasegawa, 2007). Il a une forme triangulaire (Barone, 2000). Il prend origine à partir de l'apophyse épineuse d'un nombre variable de vertèbres cervicales et des premières vertèbres thoraciques (Baumel et al., 1993). Matsuoka et Hasegawa (2007) ont observé chez le cygne chanteur (*Cygnus cygnus*) que ce muscle se développe à partir des processus épineux de trois vertèbres thoraciques. Malgré cela, il reste le muscle le plus superficiel et son attache aponévrotique ne semble pas se fixer directement sur les os, mais semble s'attacher secondairement aux processus épineux, avec les aponévroses des muscles

sous-jacents situées entre eux. Il se termine entre les têtes scapulaire et humérale du muscle triceps brachial.

Ce muscle agit en tirant l'aile caudalement, en fléchissant et en élevant l'humérus, et en contrôlant ainsi le mouvement de l'humérus lors de la contraction des muscles pectoraux et supra-coracoïde (Zimmermann et al., 2012). Cela maintient ce muscle presque toujours contracté pour maintenir les ailes contre le corps (Wessel et al., 2010). Le grand dorsal aviaire est d'une grande importance pour les biologistes musculaires et les chercheurs travaillant dans les domaines de la dystrophie musculaire et des interactions neurotrophiques (Geyukoulu et al., 2005). Ce muscle joue un rôle crucial dans la locomotion aviaire et est souvent étudié pour comprendre les mécanismes sous-jacents à ces conditions pathologiques et aux interactions complexes entre le système nerveux et les muscles.

I.2.2 Au niveau du membre pelvien

I.2.2.1 Au niveau de la cuisse

Les muscles de la cuisse sont puissants, allant d'un bout à l'autre du bassin et même le dépassant, pour se terminer à hauteur du genou (Chatelain, 1986).

I.2.2.1.1 Le muscle Sartorius (Sart)

Appelé aussi muscle iliotibial crânial, le muscle Sart appartient au groupe musculaire iliotibial qui contient en outre le muscle pectiné, le muscle iliotibial latéral, le muscle iliotibial médial et le muscle biceps fémoral (James et Gart., 1993). Il existe des variations selon les espèces aviaires dans les attachements proximaux de ce muscle aux vertèbres thoraciques caudales, au synsacrum et au précétabulaire de l'ilium. Ce muscle peut présenter plus d'une tête (Baumel et al., 1993). Le Sart est un muscle en forme de lanière qui provient de la crête iliaque antérieure et s'insère sur le ligament rotulien, fonctionnant pour l'extension du fémur (Torella et al., 1996). Tandis que McFarland et al. (2008) ont dit que le Sart provient de la face crâniale de la crête iliaque, via un tendon court. Il longe le bord crânial de la cuisse et passe médialement pour s'insérer sur le bord antérieur du tibiotarse, en profondeur jusqu'au muscle gastrocnémien médial, il participe à la flexion de la hanche. Il est largement considéré comme le principal protracteur de la hanche (Smith et al., 2007).

II. MISE EN PLACE ET DEVELOPPEMENT DES MUSCLES DU POULET DE CHAIR

Chez le poulet, le mésoblaste se segmente en somites à partir de la 20^{ème} heure. La région dorsolatérale va former le derme et le myotome. Les cellules du myotome donneront les muscles paravertébraux, intercostaux et abdominaux. De la région ventrolatérale du dermomyotome migrent des cellules donnant les myoblastes qui coloniseront les bourgeons des membres (Ott et al., 1990). L'analyse de la myogenèse embryonnaire des vertébrés a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle les myoblastes suivent une séquence chronologique d'apparition, toutes comme les fibres musculaires, et diffèrent les uns des autres en fonction des stades de développement (stade embryonnaire, foetal, néonatal et adulte) (Stockdale, 1990). Robelin et al. (1993) suggèrent que cette chronologie est fonction de la durée de la gestation et du poids de l'animal à la naissance.

La cinétique d'apparition des deux populations (primaire et secondaire) varie selon la maturité des différentes espèces (Picard et al., 2002), ainsi chez le poulet les fibres primaires apparaissent entre 3 et 7 jours avant éclosion, par contre les fibres rapides entre 8 et 16 jours avant éclosion. Les myotubes primaires présentent des caractéristiques fonctionnelles qui correspondent à celles des fibres rapides. À leur suite apparaissent les fibres secondaires qui entourent les myotubes primaires, ces dernières ont une taille inférieure aux moyotubes primaires (Remignon, 1993).

Chez toutes les espèces, les myotubes de la génération primaire représentent une proportion limitée des fibres futures, tandis que ceux de la génération secondaire qui les utilisent comme échafaudage constituent une population beaucoup plus importante (Soussi-Yanicostas, 1991; Stål et al., 1994). On pense généralement que les fibres primaires deviennent des fibres lentes de type I chez l'adulte, cependant, dans les muscles entièrement rapides, elles donnent naissance à des fibres rapides. Les fibres secondaires se transforment principalement en fibres rapides dans les muscles rapides et en fibres rapides ou lentes dans les muscles mixtes (Lefaucheur et al., 1995 ; Picard et al., 1995).

III. CLASSIFICATION DES FIBRES MUSCULAIRES

Le muscle squelettique est constitué de différents types de fibres qui interviennent dans la contraction, la détermination de leurs caractéristiques joue un rôle majeur dans les études physiologiques sur le muscle tout comme dans l'étude des mécanismes de transformation des muscles en viande (Meunier et al., 2010). La contraction musculaire nécessite de l'énergie sous forme d'ATP, dont les besoins diffèrent fortement selon les types de fibres. Deux voies majeures de régénération de l'ATP sont utilisées dans le muscle : la voie oxydative (aérobie) et la voie glycolytique (anaérobie). L'importance relative de ces deux voies détermine le type métabolique des fibres : oxydatives (rouges car riche en myoglobine qui est le transporteur d'oxygène et pigmente le muscle en rouge), et glycolytiques (blanches presque dépourvues de myoglobine car les besoins en oxygène sont très limités) (Listrat et al., 2015).

Les techniques utilisées classiquement dans les différentes espèces pour le typage des fibres reposent sur des méthodes histochimiques appliquées sur des coupes de muscles (Picard et al., 1998). Comme chez les mammifères, les fibres musculaires du poulet peuvent être classées sur la base de leurs propriétés contractiles par l'inhibition sélective de l'activité ATPasique myofibrillaire située au niveau des têtes des chaînes lourdes de myosine (MyHC) qui est la seule protéine myofibrillaire présentant une activité enzymatique (type contractile lent /rapide)(Brooke et Kaiser., 1970) et/ou sur la Co révélation de l'activité d'une enzyme de leur métabolisme énergétique , la succinate déshydrogénase (type métabolique oxydatif/glycolytique).

Les techniques de coloration histochimique peuvent être utilisées pour décrire les caractéristiques complexes du muscle et pour identifier différents types de fibres musculaires (Morita et al., 2000 ; Ozawa et al., 2000). Différentes méthodes d'identification histochimique des types de fibres musculaires ont été introduites au fil des ans. Les différentes classifications des types de fibres se sont concentrées sur un ou quelques aspects des performances contractiles et métaboliques et ont défini les types de fibres en fonction de paramètres sélectionnés (Bottinelli et Reggiani., 2000).

III.1 Classification des fibres musculaires selon leur activité contractile

C'est Engel en 1962 qui a été le premier à proposer de distinguer les fibres musculaires en fonction de leur activité à pH 9,4. Il a alors identifié deux types de fibres, I et II, montrant respectivement des activités faibles et fortes après une incubation à ce pH. Cette réaction

s'inverse après une préincubation acide (Herbison et al., 1982). Plus tard, Brooke et Kaiser (1970) ont proposé d'ajouter un deuxième pH de préincubation acide qui leur a permis de distinguer trois sous-groupes parmi les fibres de type II (IIA, IIB et IIC). Le premier pH de préincubation acide permet de différencier les fibres lentes de couleur noire (de type I) des fibres rapides de couleur blanche (ou de type II). Le deuxième pH de préincubation acide révèle des fibres noires (identifiées précédemment comme étant de type I), des fibres peu inhibées qui apparaissent en gris (classées comme fibre IIA) et des fibres qui restent claires, classées comme fibres de type IIB.

Ce mode de classification est aujourd'hui largement accepté et trouve sa réalité physiologique dans les propriétés contractiles du muscle. En effet, les fibres présentant une activité ATPasique faible à pH alcalin et forte à pH acide sont celles qui ont une vitesse de contraction lente (type I). À l'inverse, celles qui présentent une activité ATPasique faible à pH acide et forte à pH alcalin sont présentes dans les muscles à vitesse de contraction rapide (type II). Parallèlement à cette vitesse de contraction, une variabilité de la fatigabilité du muscle est observée : les muscles rapides sont facilement et fortement mobilisables mais très fatigables ; à l'inverse, les muscles lents sont capables de se contracter de façon plus prolongée mais sont moins mobilisables rapidement (Mayene et al., 1991).

III.2 Classification des fibres musculaires selon leur métabolisme énergétique

Ashmore et Doerr (1970) ont proposé de classer les fibres musculaires sur la base de la vitesse de contraction, de la couleur et de leur métabolisme énergétique (Tableau 1). Pour cela, ils utilisent une préincubation acide et une autre alcaline qui après révélation de l'activité ATPasique leur permet de distinguer des fibres à vitesse de contraction lente (β) et des fibres à vitesse de contraction rapide (α). Leur étude se poursuit par la révélation de l'activité de la succinate déshydrogénase (SDH), Celle-ci permet de classer les fibres en trois sous-groupes :

- Les fibres de type (β_r) ou rouge lente, caractérisées par une vitesse de contraction lente et un métabolisme oxydatif dominant, (coloration bleu foncé)
- Les fibres de type (α_r) ou rouge rapides caractérisées par une vitesse de contraction rapide et un métabolisme à la fois oxydatif et glycolytique, (coloration bleue faible)
- Les fibres de type (α_w) ou blanches rapide caractérisées par une vitesse de contraction rapide et un métabolisme glycolytique dominant (Joandel, 1997).

Tableau 1: Nomenclature des fibres musculaires chez les oiseaux (Berri & Duclos, 2003)

Type selon Ashmore et Doerr (1971)	α_w	α_r	Br	β'	α'
Type selon Barnard et al. (1982)	IIB	IIA	I	IIIb	IIIa
ATPase (pH acide)	-	-	+	+	+/-
ATPase (pH basique)	+	+	-	+	+/-
Succinate déshydrogénase (SDH)	+	++	++	++	++

Selon leur activité ATPasique, les fibres du muscle squelettique ont été classées dans les catégories I, IIA et IIB (Brooke et Kaiser, 1970), qui semblent correspondre assez étroitement à la classification métabolique décrite par Peter et al. (1972) respectivement en fibres à oxydation lente (SO), fibres oxydatives glycolytiques rapides (FOG) et fibres glycolytiques rapides (FG). Les chercheurs (Cordonnier et al., 1995 ; Singh et al., 2002) ont utilisé cette dernière classification dans leurs travaux. Cependant, Fuentes et al. (1998) ont classé les myocytes des muscles biceps et triceps brachial du rat et du lapin en fibres lentes (SO), glycolytiques rapides (FG), glycolytiques oxydatives rapides (FOG et FOG) et fibres oxydatives rapides (FO). Les deux classifications précédentes, considérées équivalentes, se sont rapidement révélées divergentes, aboutissant à l'identification d'autres sous-types (Pette & Staron, 1990).

Parallèlement à ces classifications les plus couramment employées, certains auteurs ont décrit diverses variantes des sous-types plus ou moins bien définis. C'est le cas de Khan (1976) qui a distingué sept types de fibres chez le poulet, ou de Swatland (1980) qui a observé chez le poulet quatre types de fibres dans le muscle pectoral superficiel et sept dans le muscle sartorius. Gollnick et Oakley (1983), quant à eux, ne distinguent que deux sous-types parmi les fibres de type I, ce qui les amène à une classification comportant cinq classes de fibres. Susuki et al. (1985) décrivaient six types de fibres dans les muscles de la cuisse du poulet (dont quatre sont de type I).

La multiplicité des classifications existantes et leur mise en évidence sous-entend de la conversion possible d'un type de fibre à l'autre (tant au niveau des types contractiles que métaboliques) et donc l'existence à un moment donné de plusieurs sous-types intermédiaires avec des limites entre classes non résolues (Staron & Pette, 1987). Ces fibres diffèrent les unes des autres par des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. Par conséquent, chaque type musculaire présente des caractéristiques structurales et biochimiques spécifiques adaptées à sa fonction. Les sources d'énergie sont notamment différentes ; ainsi, les

cellules musculaires adaptent leur équipement enzymatique à leur source d'énergie. Par exemple, les muscles blancs utilisent la voie de la glycolyse pour la production d'énergie, tandis que les muscles rouges ont un métabolisme oxydatif et utilisent le cycle de Krebs (Joandel, 1997). Cela renforce alors l'idée que le muscle est dans un état dynamique et que de nombreux facteurs peuvent intervenir dans sa mise en place définitive (Remignon, 1993).

III.3 Détermination des différents types de fibres musculaires chez le poulet

Chez les oiseaux comme chez les mammifères, les muscles sont soit formés d'un seul type de fibre soit, et c'est la majorité des cas, d'une mosaïque de fibres lentes et rapides dans des proportions variables (Berri & Duclos, 2003). Les travaux de Barnard et al. (1982) ont permis d'établir une classification similaire à celle employée chez les mammifères, mais tenant compte des spécificités aviaires (Tableau 1). Cinq types de fibres sont alors décrits en fonction de l'activité ATPasique des myofibrilles : deux d'entre elles sont à contraction rapide (types IIA et IIB), tandis que les trois autres sont des fibres à contraction lente (types I, IIIa et IIIb). La classe additionnelle par rapport aux mammifères est celle des fibres toniques multi-innervées regroupées dans le groupe III. Cette classe de fibres est rarement présente chez les mammifères.

De plus, les fibres de type I chez les oiseaux sont multi-innervées et rares, alors qu'elles sont plus nombreuses et mono-innervées chez les mammifères (Remignon, 1993). Ces fibres lentes toniques de type IIIa et IIIb ne sont pas retrouvées chez les mammifères mais se trouvent dans des muscles tels que le muscle plantaire et l'Antérieur Latissimus Dorsi (ALD) des oiseaux (McKee, 2003). Ce muscle reste contracté la plupart du temps parce que sa fonction est de maintenir les ailes des oiseaux contre le corps (Goldspink, 1999 ; Wessel et al., 2010).

la masse corporelle et assurent la fonction locomotrice de vol (Rosser et al., 1996). En comparant les muscles pectoraux de 31 espèces aviaires, ces auteurs ont pu mettre en évidence une très grande hétérogénéité en isoformes de MyHC rapides au sein des fibres, correspondant aux différentes propriétés contractiles requises pour le mode de vol de chacune des espèces. Ainsi, les muscles pectoraux des espèces domestiques ou non migratrices contiennent exclusivement des fibres rapides glycolytiques (IIB ou $\alpha\omega$), capables de fournir une série de contractions rapides et puissantes mais pendant un temps bref.

À l'opposé, les muscles pectoraux des oiseaux migrateurs contiennent des fibres rapides oxydatives glycolytiques (IIA ou $\alpha\tau$), caractérisées par des propriétés contractiles légèrement moins rapides et puissantes mais, en raison de leur meilleure résistance à la fatigue, à même de

soutenir un effort prolongé. Smith et al. (1988) ont trouvé dans la partie profonde des muscles pectoraux des fibres lentes (I ou β r) capables de maintenir une activité contractile modérée mais prolongée. Chez le poulet ou la dinde, la proportion de ces dernières est très faible (1%), mais chez certaines espèces comme l'autruche, elle peut atteindre 39% (Rosser et George, 1995).

Par contre les muscles de la cuisse et les pattes sont généralement décrites comme étant de type lent oxydatif (I ou β r) (Rémignon & Desrossiers, 1998) ; ce dernier type de fibre (I ou β r), qui rentre dans la composition de la plupart des muscles de posture, est le plus souvent localisé dans les régions riches en fibres rapides oxydo-glycolytiques « IIA ou α r » (Rosser et al., 1987).

IV. VARIABILITE INTER ET INTRA MUSCULAIRE

Notre point de vue est que chaque muscle humain est unique en ce qui concerne son complément de types de fibres (Thornell et al., 2015). Selon Bottinelli et Reggiani (2000) ainsi que Pette et Staron (2001), le muscle squelettique est un tissu très hétérogène, composé d'une mosaïque de types de fibres fonctionnellement diverses qui contribuent à une variété de capacités fonctionnelles. Cependant, la composition des types de fibres peut varier considérablement selon l'espèce, le type de muscle et sa fonction (Klont et al., 1998). Choi et Kim (2009) ont cité qu'il existe des différences marquées dans les caractéristiques histochimiques entre les muscles et à l'intérieur de ceux-ci.

IV.1 Variabilité inter musculaire

Hunt et al. (1977) ont confirmé des différences intermusculaires dans la distribution des différents types de fibres musculaires chez cinq muscles des bovins (longissimus, glutéal moyen, psoas majeur, semi-membraneux et semi-tendineux). Duchamp et al. (1992) ont également approuvé que les muscles des pattes aviaires ont une distribution hétérogène de fibres oxydatives, glycolytiques et oxydatives glycolytiques. Torella et al. (1996), dans une étude sur six muscles répartis sur l'aile et la patte des canards colverts (ps, extenseur radio-métacarpe, scapulohuméral caudal, triceps scapulaire, sartorius et gastrocnémien latéral), ont trouvé que les trois types de fibres (SO, FG et FOG) présentaient une répartition inégale dans tous les muscles étudiés.

La répartition des types de fibres au sein de chaque muscle est liée principalement au rôle joué par chaque muscle au niveau du corps et cela est constaté par Goldspink et Yang

(1999). Les fibres de type IIA se trouvent dans les muscles qui se déplacent rapidement de façon répétitive comme la partie mixte du muscle Sart ; par conséquent, ils ne se fatiguent pas aussi facilement que le type IIB glycolytique, qui subissent une contraction rapide mais sont plus facilement fatigables que les fibres de type IIA et de type I. En raison de sa distribution régionale dans le muscle, il est postulé que les fibres lentes I (SO) jouent un rôle important dans le maintien de la posture (Suzuki et al., 1982 ; Torella et al., 1996) alors que les fibres rapides restantes sont inactives (McFarland et al., 2008).

Les fibres lentes toniques de type IIIA et IIIB ne sont pas retrouvées chez les mammifères mais dans des muscles tels que le muscle plantaire et le muscle grand dorsal (ALD) de l'espèce aviaire (Goldspink & Yang, 1999). Les muscles biceps brachial et brachial bovin ont des pourcentages élevés de fibres rouges à contraction lente aux alentours de 50%, avec des pourcentages plus faibles dans les muscles longissimus dorsal et biceps fémoral (environ 22,3% et 10,5 %, respectivement) (Kirchofer et al., 2002).

IV.2 Variabilité intra musculaire

Il est bien connu que les muscles peuvent être fonctionnellement subdivisés en régions ayant des fonctions spécifiques (Boggs & Dial, 1993). La proportion et la distribution régionale des types de fibres dans le muscle semblent être liées au degré de complexité fonctionnelle (Fuentes et al., 1998). Hunt et al. (1977) ont confirmé des différences intra musculaires dans la répartition des différents types de fibres musculaires entre la partie interne et externe des muscles semi membraneux et semi tendineux chez les bovins. Par contre Brandstetter et al. (1997) ont trouvé chez la même espèce une diminution des activités glycolytiques et simultanément une augmentation de la capacité oxydative des fibres du muscle semitendineux de l'extrémité proximale → médiale → distale en début de croissance mais à l'âge d'abattage (16 mois), aucune différence entre les trois parties n'a été détectée.

Les types de fibres dans les muscles des membres sont souvent disposés de telle sorte que le pourcentage de fibres SO et les FOG vers les régions les plus profondes du muscle, près de l'os, tandis que le pourcentage de fibres FG augmente vers les zones superficielles du muscle (Acosta & Roy, 1987). Dans les muscles du rat, la zone musculaire la plus profonde a une plus grande proportion de fibres de type I et une capacité oxydative plus élevée que la zone plus externe (Philippi & Sillau, 1994). Chez les porcs, de nombreux muscles ont une distribution unique de fibres, où les fibres de type I sont regroupées en grappes et les fibres de type IIA sont

à proximité immédiate, et ces dernières sont ensuite coiffées de fibres de type IIB (Henckel et al., 1997).

Des différences importantes dans la distribution régionale de l'ensemble des fibres musculaires ont été observées entre le rat et le lapin par Fuentes et al. (1998) ; Chez le rat, les fibres de SO étaient limitées aux régions profondes des muscles biceps et du triceps brachial, alors que les fibres de FG étaient situées dans les régions intermédiaires et superficielles (les régions superficielles contenaient les pourcentages les plus élevés de fibres de FG). Chez le lapin, les fibres SO et FG s'étendent sur tout le muscle, bien que les fibres SO et FG soient plus abondantes dans les régions profondes et superficielles, respectivement. Ces résultats indiquent que le biceps et le triceps brachial sont plus régionalisés chez le rat que chez le lapin.

Un travail a été publié sur la proportion des types de fibres de 22 muscles couvrant les articulations de l'épaule et / ou du coude de trois singe de type *Macaca mulatta* réalisé par Singh et al. (2002) ; dans la plupart des muscles, les fibres de FG prédominaient, mais les proportions allaient de 25 à 67% dans différents muscles. Les fibres SO étaient moins abondantes sauf dans quelques petits muscles profonds où elles constituaient jusqu'à 56% des fibres. Dans une recherche portée sur 11 muscles du membre postérieur d'un oiseau de rivage (Échasse à col noir), McFarland et al. (2008) ont constaté que la plupart des muscles examinés montraient une régionalisation des fibres lentes cohérente d'un individu à l'autre.

Certains muscles ont montré un mélange de fibres lentes et rapides le long de la moitié médiale du muscle, mais aucune fibre lente latéralement, d'autres muscles ont montré des fibres musculaires lentes exclusivement latérales au tendon interne, et fibres mixtes rapides et lentes en dedans du tendon. De plus, la plus faible variabilité des ratios de types de fibres (fibres lentes/ fibres rapides) a été observée dans les muscles les plus gros (gastrocnémien et *iliotrochantericus caudalis*), tandis que les petits muscles (le muscle plantaire et *iliotrochantericus medius*), avaient une plage beaucoup plus large de fibres lentes. Il semble que l'entraînement modifie la composition fibrillaire du muscle squelettique équin selon un ordre de conversion que voici : IIX → IIA → I (Cotrel, 2004).

V. MESURE DES PARAMETRES MORPHOMETRIQUES DES FIBRES MUSCULAIRES

V.1 Nombre total des fibres musculaires (nbFT) d'un muscle

Il est bien connu que le nombre de fibres musculaires, la taille et la composition en fibres sont étroitement liés les uns aux autres (Ryu et al., 2004). L'augmentation de la masse musculaire squelettique est influencée par les caractéristiques de la fibre musculaire (Bee et al., 2006 ; Puolanne et al., 2006 ; Chen et al., 2007). Le taux de croissance postnatal de la fibre musculaire individuelle est plus faible lorsqu'il y a un grand nombre de fibres et plus élevé lorsqu'il y a un faible nombre de fibres. Ceci peut être conclu du fait que le nombre de fibres musculaires est inversement corrélé à l'épaisseur des fibres musculaires à la fin de la période de croissance intensive (Rehfeldt et al., 2000).

V.1.1 Techniques utilisées pour calculer le nombre total des fibres musculaires (nbFT)

Plusieurs techniques ont été utilisées pour estimer le nombre total de myocytes dans les muscles ; Gollnick et al. (1983) ont effectué des comptages directs de ce nombre sur des fibres disséquées du muscle ALD après digestion à l'acide nitrique, toutes les fibres qui possédaient des appendices ou des clivages centraux, même lorsque les appendices résultants se sont ensuite réunis pour former une seule fibre, ont été classées comme fibres bifurquées. La fréquence des fibres bifurquées dans les muscles a été déterminée en examinant les fibres sur toute leur longueur chez les oiseaux dont les sections médianes n'ont pas été prélevées pour l'analyse histochimique en se basant sur des recherches précédentes qui ont dit que la prolifération des fibres a été attribuée à une division longitudinale des fibres préexistantes.

Remignon (1993) ; Remignon et al. (1995), ont calculé ce nombre à partir de la surface transversale moyenne des fibres et de la surface musculaire totale après soustraction de la surface en pourcentage occupée par le tissu conjonctif par l'application de l'équation suivante :

$nbF = A \times (100 - TC) / S$ où nbF = nombre total des fibres, A = aire de section du muscle, TC = pourcentage du tissu conjonctif et S = surface moyenne d'une fibre.

La surface moyenne d'un champ, le nombre de fibres par champ et l'aire de section du muscle sont obtenus par analyse d'images, le pourcentage du tissu conjonctif est estimé à l'aide d'un oculaire à grille. Scheuermann et al. (2004) ont estimé ce paramètre en calculant le nombre

total apparent de myofibrilles (MFN) par la multiplication du nombre moyen de myofibrilles sur la surface du champ microscopique par la surface totale de la section transversale du muscle, obtenue à l'aide d'un planimètre Ott. Le nombre total des fibres a été dénombré aussi en divisant la surface maximale d'un muscle déterminée par imagerie résonance magnétique, sur la surface moyenne des fibres du même muscle calculée après une biopsie musculaire (Macdougall et al., 1984 ; Matoba et al., 1985 ; KLEIN., 2003). Mais ces biopsies peuvent être sous-optimales pour les études de caractérisation primaires en raison de problèmes d'échantillonnage (Hui Meng et al., 2014).

Néanmoins, les chercheurs n'arrivent pas à capturer toute la surface d'une coupe colorée, qui peut être elle-même la surface totale d'un muscle, avec une seule capture d'image ce qui a obligé certains d'eux à faire plusieurs images, de faible grossissement (x4) comme Garton et al. (2010) ou (x20) comme Wen et al. (2018), couvrant toute la surface du muscle puis les assembler pour former un montage d'une image complète à l'aide de Photoshop. De l'autre côté, il existe, dans certains muscles, une variabilité régionale considérable concernant la taille des fibres, de sorte que la mesure ou l'échantillonnage de seulement quelques petites zones ne fournira pas, nécessairement, des mesures représentatives (Liu et al., 2013).

V.1.2 Facteurs qui influencent le nombre total des fibres musculaires (nbTF) par muscle

En principe chaque muscle d'un être vivant a un nombre fixe de myocytes, et la croissance postnatale est due seulement à la croissance radiale et longitudinale et pas à l'augmentation des fibres musculaires, mais le nombre total de fibres musculaires pour chaque muscle est influencé par plusieurs facteurs comme le muscle, l'espèce, l'activité physique, le sexe, la sélection génétique et l'âge.

V.1.2.1 Muscle

Chaque être humain possède plus de 600 muscles squelettiques (Bruce, 2019). Selon Choi et Kim (2009), la taille et le nombre des fibres musculaires sont des facteurs qui influencent la masse musculaire. Au cours du développement postnatal, lorsque le nombre de fibres musculaires est élevé, les fibres se développent généralement plus lentement. Inversement, les fibres poussent plus rapidement lorsque le nombre de fibres est faible dans la volaille.

A notre connaissance aucune étude n'a été faite jusqu'à présent pour compter le nombre total des fibres musculaires existantes au niveau de chaque muscle pour un être vivant, et la plupart des recherches qui ont été réalisées ont ciblé seulement des muscles qui ont un intérêt scientifique ou économique. En principe la taille des muscles est positivement liée à la taille de l'animal, le nbFT est variable d'un muscle à l'autre chez le même sujet vu la taille et la morphologie différente de l'ensemble de ses muscles. Singh et al. (2002) ont illustré le nbFT de 22 muscles couvrant les articulations de l'épaule et / ou du coude d'un singe de type « *Macaca mulatta* », ce nombre selon ces auteurs est très variable selon le type du muscle, il varie de 347 à 9837 fibres/muscle.

V.1.2.2 Espèce

L'effet d'espèce sur le nbTF de chaque muscle n'a pas été bien étudié par les chercheurs, mais les données existantes ont confirmé qu'il y'a eu des différences concernant ce nombre entre les espèces. Selon Rehfeldt et al. (1999) les bovins présentent un nombre de fibres 3 à 4 fois plus élevé que les porcs pour les muscles semitendineux et longissimus, mais avec des fibres musculaires de même taille ou même plus petites. Ces mêmes chercheurs ont trouvé que le nbTF pour le muscle long extenseur des doigts est 3 à 4 fois supérieur chez le rat que chez la souris. En conclusion, les différences de masse musculaire spécifiques aux espèces sont principalement dues à des différences dans le nombre total de fibres musculaires.

V.1.2.3 Activité physique

Des résultats contradictoires ont été signalés pour le nbTF après une activité physique ; Gollnick et al. (1983) ont confirmé que l'hypertrophie du muscle ALD du poulet en réponse à une surcharge chronique après un accrochement des poids de 100 ou 200 g selon la taille corporelle du poulet sur l'aile, est due à une hypertrophie des fibres préexistantes et non à des fibres nouvellement formées. Par contre Shorey et Cleland (1983) ; Giddings et Gonyea (1992) ont rapporté qu'un étirement de l'aile, induit par une surcharge pondérale expérimentale, entraîne une augmentation du nombre total de fibres dans le muscle ALD du poulet. Tamaki et al (1992) ont dit que l'exercice imposé au muscle peut aussi être un moyen pour augmenter le nombre de fibres musculaires chez le rat, mêmes constatations observées par McCormick et Schultz (1992), ces derniers auteurs ont précisé que le mécanisme de formation des fibres de novo est induit par la migration de cellules satellites mais restent différent de celui de la régénération musculaire.

Il est clair que la mise en œuvre précoce de l'exercice en tant que modification du mode de vie devrait se traduire par un meilleur maintien des types de fibres musculaires responsables du métabolisme oxydatif (Lowenthal et al., 2006). L'hypertrophie des fibres associée à l'exercice est généralement de type II et cet élargissement des fibres II peut expliquer la différence normale entre le muscle du mâle (dans lequel les fibres de type II sont plus grosses que le type I) et le muscle de la femelle (dans lequel elles sont grossièrement de taille égale) (Dubwitz et al., 2013).

V.1.2.4 Sexe

Deux théories contradictoires ont été rapportées concernant la détermination du nombre de fibres musculaires selon le sexe ; les adeptes de la première théorie ont dit que le nbFT n'est pas affecté par le sexe, citant des recherches qui ont été réalisées chez plusieurs espèces : plusieurs muscles de souris (Nimmo & Snow, 1983), le muscle pectiné de chien (Ihemelandu, 1980), le muscle vaste latéral de l'homme (Schantz et al., 1983), le muscle longissimus du porc (Rehfeldt, 1995). Chiang et al. (1995) ont constaté que le sexe des poulets n'avait aucune influence sur la proportion de types ou de zones de fibres musculaires.

Par contre les partisans de la deuxième théorie ont affirmé une différence dans le nbFT entre les mâles et les femelles, des différences liées au sexe dans le nbFT ont été signalées chez les humains (Henriksson-Larsén, 1985), les rats (Joubert et al., 1994 ; Rehfeldt et al., 1994), les bovins (Papstein et al., 1999) et les poulets (Rehfeld et al., 1997). Dans ces cas, les mâles présentaient un nombre de fibres musculaires plus élevé que les femelles. Scheurmenn et al. (2004) ont signalé que le poulet de chair mâle avait une plus grande densité de fibres musculaires dans le muscle pectoral que le poulet de chair femelle. Des différences liées au sexe dans le nombre de fibres musculaires ont été trouvées pour le muscle extenseur *hallucis longus* du poulet (Tùmová & Teimouri, 2009).

V.1.2.5 Race et sélection génétique

Les augmentations génétiquement programmées de la masse musculaire doivent être dues à un plus grand nombre de myofibres, à des myofibres plus grandes ou à une combinaison de ces deux facteurs (Smith, 1963). Une partie de chercheurs ont pensé que l'augmentation de la masse musculaire des animaux modifiés ou sélectionnés génétiquement est due à une augmentation du nbFT ; Mizuno et Hikami (1971) ont également signalé que les différences de volume musculaire entre le type de ponte et le type de viande chez les poulets résultent

principalement des différences de nombre de fibres. Fowler et al. (1980) ont découvert que la différence de taille du muscle semi-membraneux entre une lignée de caille japonaise à gros corps et la lignée à petit corps était principalement due au nombre de cellules plutôt qu'à la taille des cellules.

Le nombre de myofibres diffère d'une race à l'autre, quel que soit le traitement nutritionnel et le sexe, ce nombre reste constant pendant la croissance jusqu'au poids de marché (Swatland, 1984). Burke et Henry (1997) ont montré que le nbFT de fibres musculaires du muscle semi-membraneux dans le poulet à chair était deux fois plus supérieur que le nbFT du même muscle chez le poulet Bantam. De plus, Scheurmenn et al. (2004) ont évalué que le nombre de myofibres apparentes dans les muscles du bréchet était plus élevé chez les poulets de chair que chez les poulets de type Leghorn, et le rendement élevé des souches de poulets de chair pourrait être attribuable à l'augmentation du nombre de myofibres apparentes.

Une autre partie de chercheurs ont confirmé que l'augmentation de la charge musculaire chez les animaux de croissance rapide est causée par une élévation du diamètre moyen des fibres et pas au nombre de fibres ; Aberle et Stewart (1983) ont étudié les caractéristiques des fibres musculaires de poulets à griller et de poulets pondeurs âgés de 3 à 11 semaines, les myofibres des muscles des poulets de chair avaient un diamètre transversal supérieur à ceux de la souche pondeuse. Horak, (1989) quant à lui n'a pas observé cette différence numérique en comparant les muscles postérieur *latissimus dorsi* et ALD chez quatre souches de poules (chaire et pondeuses). Dransfield et Sonnicki (1999) ont signalé que les poulets mâles à croissance rapide avaient des fibres musculaires pectorales trois à cinq fois plus larges que les poulets à croissance lente. En revanche Prentis et al. (1984) ont démontré que la différence de race dans le poids musculaire du muscle *iliotibialis lateralis* résultait de différence aux diamètres des fibres, tandis que, contrairement à cela, la différence de race dans le muscle Ps était due à un nombre différent de fibres.

La troisième partie des chercheurs ont trouvé que les deux facteurs, nombre et diamètre sont responsables sur la différence en masse musculaire en faveur des animaux et/ou des races à croissance rapide. Remignon et al. (1995) après avoir comparé la croissance musculaire de deux souches l'une à croissance rapide et l'autre de croissance lente, ont trouvé que nbFT dans un muscle est toujours plus élevé chez les oiseaux à croissance rapide, quel que soit le muscle (Ps ou ALD) ce qui les a laissés penser que l'augmentation du taux de croissance résulte d'une augmentation à la fois de la taille et du nombre de fibres, malgré ils n'ont pas constaté une augmentation significative du nombre total de myocytes dans ces deux muscles au cours de la

croissance. La sélection pour augmenter le taux de croissance a entraîné des changements concomitants du nombre et de la taille des fibres musculaires chez les porcs (Choi et al., 2013 ; Kim et al., 2013).

V.1.2.6 Age

Rehfeldt et ses collaborateurs (2000) ont confirmé que la croissance postnatale du muscle squelettique est principalement réalisée par l'augmentation de la longueur et de la circonférence des fibres musculaires, mais pas par l'augmentation du nombre de fibres musculaires. Le nombre total de fibres musculaires reste inchangé chez les animaux et l'homme et qu'aucun changement significatif du nombre de fibres postnatales n'a été observé chez : le rat (Rosenblatt & Woods, 1992 ; Schadereit et al., 1995), les bovins (Wegner et al., 2000 ; Picard et al., 2003), le poulet (Gollnick et al., 1983 ; Swatland, 1984), l'homme (Klein et al., 2003). Ces derniers auteurs ont estimé que le nombre de fibres musculaires n'était pas significativement différent entre les jeunes hommes et les personnes âgées concernant le biceps brachial, par conséquent la vieillesse n'est pas associée à un nombre réduit de fibres musculaires dans ce muscle et que la réduction du nombre de fibres lors de l'atrophie musculaire liée à l'âge pourrait être dépendre du muscle.

En revanche, chez certains poissons, le nbFT augmente encore au cours de la vie postnatale (Picard et al., 2003).

A l'inverse des deux points de vue précédents, Grimby et saltin (1983) ont trouvé que le nombre total de fibres musculaires, chez l'homme, décroît de la naissance jusqu'à l'âge adulte, ces résultats sont approuvés par les travaux de Rehfeldt et al. (1999) et Thompson (2002) qui ont trouvé que le nombre total de fibres musculaires est considérablement réduit avec l'âge, à partir d'environ 25 ans et progressant à un rythme accéléré par la suite. Le taux de croissance postnatal de la fibre musculaire individuelle est plus faible lorsqu'il y a un grand nombre de fibres et plus élevé lorsqu'il y a un faible nombre de fibres. Ceci peut être conclu du fait que le nombre de fibres musculaires est inversement corrélé à l'épaisseur des fibres musculaires à la fin de la période de croissance intensive (Rehfeldt et al., 2000).

V.2 Aire de Section Transversale (AST)

Le poids du muscle dépend du nombre total de fibres (TNF), de la section transversale des fibres (AST) et de la longueur (Tůmová & Teimouri, 2009). Les espèces aviaires sélectionnées sur le critère de croissance élevée se caractérisent par un développement

musculaire important dès la première semaine de vie. Le processus de développement et de maturation des fibres musculaires, important chez le poulet de chair, sont extrêmement précoces, limité dans le temps et les deux premiers jours semblent être une période cruciale pour le développement musculaire du poussin (Bigot et al., 2001).

Selon Roy et al. (1996) la taille des fibres est une mesure plus précise que le poids musculaire en raison des changements potentiels absolus et relatifs du liquide interstitiel, du tissu conjonctif et d'autres éléments non musculaires associés à l'atrophie et à l'hypertrophie. Une mesure couramment utilisée de la taille de la fibre qui est l'AST, notamment parce que les chercheurs effectuant des études physiologiques normalisant leurs résultats aux mesures de l'AST obtenues avec leurs instruments

Malheureusement, bien que les mesures de l'AST puissent refléter avec précision la taille de la fibre dans des sections transversales parfaites, elles dépendent largement de l'orientation de la fibre (dans la mesure où les fibres longitudinales ou à section oblique auront des mesures d'AST artificiellement élevées) et ne sont donc pas idéales pour la taille de la fibre (Meng et al., 2014). L'AST des fibres individuelles est une mesure importante de la plasticité des muscles squelettiques et pour déterminer la réponse atrophique ou hypertrophique d'un muscle squelettique (Roy et al., 1991).

V.2.1 Techniques de mesure de l'Aire de Section Transversale (AST)

L'AST du muscle ALD a été estimé par Gollnick et al. (1980) à partir de 50 fibres pour chaque type de fibre mesurée dans trois endroits différents de la section par un planimètre associé à un analyseur d'images numériques sur des images projetées directement à partir de la lame histochimique. L'AST des myocytes a été obtenu en imprimant l'image de la section transversale de chaque muscle sur une seule page de papier. Ce papier a été ensuite coupé pour se conformer aux limites musculaires photographiées. La masse de la photographie a été comparée après à la masse de papier représentative de 1 mm², obtenue en utilisant la barre d'échelle pré-photographiée (McFarland et al., 2008). Après il a eu l'émergence des logiciels universels et spécialisés qui utilisent des algorithmes capables de compter automatiquement ce paramètre à partir des images histoenzymologiques des tissus musculaires.

V.2.2 Facteurs qui influencent l'aire de section transversale (AST)

Ce paramètre est influencé par plusieurs facteurs citant :

V.2.2.1 Espèce

La typologie des fibres est très variable selon l'espèce, le type de muscle et sa fonction (Klont et al., 1998), ceci est prouvé par les travaux de Picard et Cassar-Malek (2009) qui ont trouvé que les trois isoformes de MyHC rapides adultes ne sont pas présentes dans les muscles matures de toutes les espèces de mammifères malgré la présence des gènes. En effet, la MyHc IIb n'est pas exprimée chez le mouton et le cheval et a été mise en évidence chez certains bovins avec de fortes différences entre races. Lorsqu'on a pris en compte l'AST, il a été constaté que les fibres FG constituaient plus de 50% de l'AST musculaire totale dans presque les 22 muscles étudiés chez le singe *Macaca mulatta* (Singh et al., 2002). Rehfeldt et al. (1999) ont indiqué que les différences de taille corporelle ne sont pas suffisamment reflétées par des différences de taille des fibres musculaires dans le muscle Longissimus de petits et grands animaux (volailles et mammifères).

V.2.2.2 Age

L'augmentation de la section transversale musculaire totale est principalement due à une augmentation de l'AST plutôt que le nombre de myofibres (Velloso, 2008). Il est bien connu que l'AST des différents types de fibres est augmenté régulièrement avec l'âge chez toutes les espèces mais avec des vitesses variables (Yamaguchiv et al., 1993 ; Remignon, 1993 ; Berri et al., 2002 ; Cotrel, 2004).

V.2.2.3 Race

La comparaison entre les races de poulets aux mêmes âges d'étude a reflété que l'AST des fibres est toujours en faveur des races ou bien des souches de croissance rapide puis croisée et en dernière position lente (Remignon et al., 1995 ; Burke et al., 1997 ; Berri et al., 2002 ; Jaturasitha et al., 2008 ; Lee et al., 2016 ; Picard & Gagaoua, 2020).

A poids vif égaux, les poids des muscles Ps sont égaux, mais la taille des fibres de la souche de croissance lente sont significativement plus grandes que celles de la souche de croissance rapide, sans doute parce que ces derniers possèdent un nombre total de fibres musculaires plus élevé (Remignon, 1995). Le nombre de fibres est négativement corrélé avec

la surface de la fibre, alors que le nombre et la surface des fibres sont corrélés positivement avec la masse musculaire dans le poulet de chair (Rehfeldt et al., 2004).

Les poulets de type Leghorn avaient une densité myofibrillaire plus élevée (c'est-à-dire plus de myofibres par millimètre carré à cause de la section transversale plus petite de leurs fibres) par rapport aux poulets de chair dans l'âge précoce (J7), pour rattraper après aux âges (J21 et J35) et devenir presque identiques (Scheurmenn et al., 2004).

V.2.2.4 Entre les sujets maigres et obèses de la même race

Les muscles avec de grandes sections transversales physiologiques ont tendance à contenir une plus grande proportion de fibres plus grandes et plus rapides (Burkholder et al., 1996). Mais Berri et al. (2003), dans un travail sur l'effet de la pression de sélection sur les muscles du filet a aussi eu des conséquences sur le muscle Sart de la cuisse, qui en plus d'un développement supérieur présenterait une réduction de la surface relative occupée par les fibres blanches glycolytique.

Dans une étude sur des poulet (lignée commerciale lourde « Hubbard Europe »), l'AST des fibres est phénotypiquement relié au poids vif et au poids du muscle. L'augmentation de l'AST des fibres chez les sujets lourds n'a pas d'incidence sur la surface occupée par le tissu conjonctif (Berri et al., 2006).

V.2.2.5 Sexe

On n'a pas étudié l'effet de sexe sur l'AST dans cette thèse, mais on a discuté l'effet de sexe sur le DMF dans la partie bibliographique. Baeza et Brillard (2004) ont constaté que malgré un effet du sexe important sur le poids vif et le rendement du filet au bénéfice des mâles, l'AST des myocytes du Ps, chez les mâles et les femelles, est équivalente. Le sexe n'a pas affecté la densité des myofibres, alors qu'il affectait la taille de la fibre, qui était plus élevée chez la femelle que chez le mâle (Verdiglione & Cassandro, 2013). Par contre Scheurmenn et al. (2004) en comparant les sexes, ont aussi rapporté que les femelles avaient plus de myofibres par millimètre carré à J21 que les mâles (donc moins d'AST pour les femelles que les mâles), mais ces chercheurs n'ont pas fait des expérimentations aux âges plus avancés pour voir à ce que la densité myofibrillaire reste au profit des femelles ou bien les choses vont s'inverser au profit des mâles.

V.2.2.6 Entre les muscles d'un même animal

Il a été postulé que la force musculaire totale était proportionnelle à sa section transversale (Bruce et al., 1997). Les études sur la force musculaire entière normalisent souvent la force maximale à l'AST du muscle entier, un concept connu sous le nom de force spécifique (Frontera et al., 2010). C'est-à-dire la petite fibre confère une moindre force de contraction du fait de la diminution du nombre de protéines contractiles, or il faut plus d'unités motrice soient recrutées pour maintenir une même force lorsque la taille des fibres diminue (Cotrel, 2004).

V.2.2.7 Type de fibre

La diversité des muscles squelettiques peut être attribuée aux caractéristiques hétérogènes des fibres musculaires individuelles et à la composition en mosaïque des nombreux types de fibres (Bottinelli & Reggiani, 2000). Il est bien connu que la croissance musculaire postnatale est principalement réalisée par une augmentation de la taille des fibres musculaires et un changement du type de fibre musculaire vers le type glycolytique qui présente la plus grande AST selon la plupart des études (Chen et al., 2007).

D'une façon générale, les fibres rouges oxydatives ont une AST inférieure à celle des fibres blanches glycolytiques. Toutefois, la hiérarchie de taille entre types de fibres peut parfois varier en fonction du muscle considéré et au sein d'un même muscle (Listrat et al., 2015). Même Singh et al. (2002) ont constaté que la taille des fibres ne soit pas toujours constante entre les muscles, la taille relative des fibres glycolytiques étaient généralement plus grandes que celles des fibres rapides oxydo-glycolytiques et les fibres lentes oxydatives au sein du même muscle. L'AST des trois types de fibres a été mesuré dans six muscles différents. Les fibres glycolytiques avaient tendance à être les plus grandes, tandis que les fibres lentes oxydatives étaient les plus petites. Tandis que la taille de type de fibre ne soit pas toujours constante entre les muscles, ainsi chez le porc, l'AST des fibres oxydatives est supérieure à celle des fibres glycolytiques dans la partie rouge du muscle Semitendineux (Realini et al., 2013).

De même dans le muscle *rectus abdomis* (bavette de flanchet) de bovins, les fibres rouges oxydatives ont une AST bien supérieure à celle des fibres blanches glycolytiques (Guillemin et al., 2009). Singh et al. (2002) ont aussi constatés que la taille d'un type de fibres donné variait d'un muscle à l'autre, de sorte que les fibres FG dans certains muscles étaient plus petites que les fibres FOG dans un autre muscle.

Enfin, les fibres musculaires sont des structures dynamiques qui peuvent passer d'un type à l'autre selon le schéma de transition suivant $I \leftrightarrow IIA \leftrightarrow IIX \leftrightarrow IIB$ (Listrat et al., 2015). Peu de travaux qui ont suivi l'évolution de l'AST des myocytes des muscles avec l'âge chez le poulet de chair, mais on a récapitulé les données disponibles de l'AST des fibres des trois muscles du poulet qui nous a intéressés pour notre travail dans le tableau suivant :

Tableau 2: Valeurs moyennes des poids des poulets et des muscles, AST des fibres des muscles (Ps, ALD et Sart) citées dans la bibliographie

Références	Race/souche et âge (jour)	Poids vif (gr)	Muscle	Poids muscle gr	IIB μm^2	I μm^2	IIA μm^2	IIIB μm^2	IIIA μm^2	IIIB μm^2
Remignon (1993)	Lignée de croissance rapide	40	Ps	/	20	137				
			Sart M	/		93	109			
			Sart R	/			116			
			ALD	/			137	137		
		7J	Ps	/	62					
			Sart M	/		65	91	123		
			Sart R	/		/	113	119		
			ALD	/			0		230	232
		21J	Ps	8,88	244					
			Sart M	0,66		189	233	281		
			Sart R			/	179	273		
			ALD	0,09			0		676	592
	35J	Ps	24,62	537						
		Sart M	1,67		410	470	502			
		Sart R			/					
		ALD	0,24			2,24		1007	889	
63J	Ps	84,16	1256							
	Sart M	5,87		944	869	1087				
	Sart R									
	ALD	0,86			6,87		2053	1578		
Remignon et al. (1996)	Y33 lignée sélectionnée	49J	Ps		2184					
			Sart M			1362	1461	1402		
			Sart R				1534	1715		
	Y11 lignée non sélectionnée	49J	Ps		2234					
			Sart M			1255	1340	1418		
			Sart R				1437	1573		
Papapinaho (1996)	Poulets mixtes Ross 208	37J	Ps		2170					
Berri et al. (2006)	Hubbard europe	42J	1861,40	Ps		1257				
			2025	Ps		1582				
			2208,42	Ps		1812				
			2247,98	Ps		2048				
			2327,65	Ps		2447				
Berri et al. (2003)	Lignée sélectionnée	J0	44,4	Ps		104,2				
		14J	252,4	Ps		378				
				Sart			175	319,7	309,5	

		J28	858,6	Ps		986,4						
				Sart			620,4	802,6	790,2			
		J42	1419	Ps		1585						
				sart			697,6	846,4	728,4			
Berri et al. (2003)	Lignée contrôlée	J0	38,6	Ps		91,3						
		14J	252,4	Ps		334,8						
				Sart			107,2	200,7	220,5			
		J28	858,6	Ps		820,2						
				Sart			404	608,8	632			
J42	1419	Ps		1234,2								
				sart			432,2	611,4	541			
Dransfield et Sosnicki (1999)	Lignée de croissance rapide	70J		Ps		1256						
Chen et al. (2007)	Arbor Acres	1J		Ps		19,35						
		14J		Ps		358,74						
		28J		Ps		553,08						
		42J	1517	Ps + Pp	195	715,04						
		56J	2614	Ps + Pp	305	845,45						
Jaturasitha et al. (2008)	Black- boned	16S		Ps				21,5				
				Ps		47,8						
	Thai- native	16S		Ps				17,7				
				Ps		45,7						
	Bresse	16S		Ps				26,3				
				Ps		52,5						
Rhode island	16S		Ps				36,5					
			Ps		48,9							
Koomkrong et al. (2015)	Arbor Acres	45J	2156,28	Ps	385,54	2860,5						
Huo et al. (2022)	Ross 308	J0	43,3	Ps		29,44						

Pp : pectoral profond, S : semaine, g : gramme

VI. DIAMETRE MOYEN DE FERET (DMF)

Il est bien connu que le nombre de fibres musculaires chez les poulets est établi avant l'éclosion. Ainsi, toute augmentation de la masse musculaire post-éclosion dépend de l'augmentation de la longueur et du diamètre des fibres musculaires (Chen et al., 2007, Verdiglione & Cassandro, 2013). Tůmová & Teimouri, (2009) ont considérés que la croissance de la fibre musculaire est contrôlée par une augmentation du diamètre et un allongement dû à l'addition de sarcomères nouvellement formés aux extrémités. Cela peut se faire par une simple mesure du diamètre des fibres les plus petites et/ou les plus grandes avec un micromètre oculaire pour établir la plage de tailles ; comme l'ont fait Toutant et al. (1980) par la mesure de diamètres avec un micromètre oculaire étalonné.

Pour chaque fibre, ils ont pris la moyenne de deux mesures perpendiculaires l'une à l'autre à raison de cinquante mesures pour chaque type de fibre dans un muscle. Smith et Fletcher (1988) en mesurant le diamètre de dix fibres provenant de deux champs distincts par emplacement avec un micromètre négatif (ou à étage), sachant que le diamètre était défini selon eux comme la section transversale la plus courte de chaque fibre. Une tablette numérique connectée à un micro-ordinateur a été utilisée pour déterminer la taille de fibre par Edman et al. (1988). Les mesures du diamètre des fibres d'un muscle ont été obtenues en faisant la moyenne des parties les plus étroites et les plus larges de chacune des 100 fibres sélectionnées au hasard par muscle, les diamètres ont été comparés à l'aide d'un test T apparié pour échantillon indépendant (McFarland et al., 2008). Le diamètre des cellules musculaires a été mesuré aussi comme la moyenne des lignes les plus longues tracées sur la longueur et la largeur de leurs sections transversales (Žikić et al., 2016).

Une évaluation plus détaillée et plus précise peut être réalisée en préparant un histogramme des diamètres des fibres et en le comparant aux données relatives à un muscle normal de même sexe et de même âge. Un certain nombre de travaux ont tenté pour automatiser et informatiser la quantification des tailles de fibre, en fonction du diamètre de la fibre ou de la surface de la fibre en section transversale, mais cela prend du temps et toutes les méthodes nécessitent un certain degré d'implication manuelle (Dubowitz et al., 2013). Le DMF (Diamètre minimal de Feret) mathématiquement a été défini selon Hosdez (2017) comme la distance entre les deux points les plus proches sur les frontières de l'objet contrairement au DMaxF (Diamètre maximal de Feret) qui a été défini comme la distance entre les deux points les plus éloignés (Figure 03).

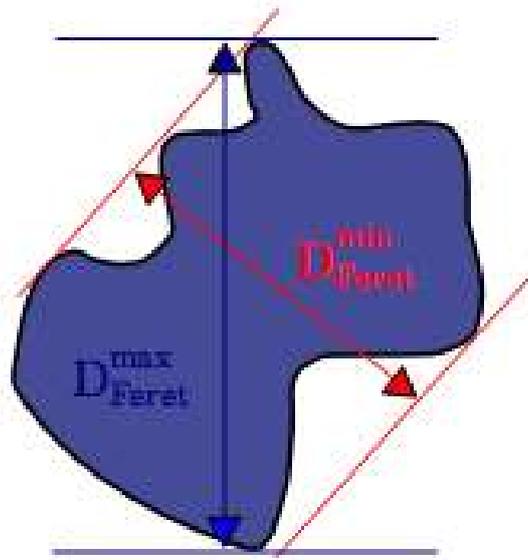


Figure 3 : Définition des DMF et DMaxF selon Hosdez (2017)

En biologie musculaire le DMF est la mesure du diamètre mineur dans la cellule musculaire. C'est une mesure préférable de la taille de la fibre musculaire qui dépend moins de sa surface transversale. (Lawlor et al., 2011 ; Meng et al., 2014). Il a été défini aussi comme le diamètre maximum du petit côté de la fibre musculaire (Dubowitz et al., 2013). Contrairement aux autres paramètres morphométriques des fibres, le DMF est très robuste contre les erreurs expérimentales telles que l'orientation de l'angle de sectionnement. De plus, le DMF détermine de manière fiable des phénotypes normaux dans un ensemble représentatif de muscles (Ruegg & Meinen, 2014).

Le DMF est beaucoup moins utilisé par la communauté des chercheurs des muscles malgré il est très résistant aux erreurs expérimentales telles que l'orientation de l'angle de section selon Liu et al. (2013), et il est recommandé par Ruegg et Meinen (2014) ; Meng et al. (2014) qui ont encouragé les chercheurs à adopter cette technique. Cette mesure est comme le montre la Figure (04) ne dépend que légèrement de l'orientation de la fibre et constitue généralement la norme de référence clinique en matière de mesure de la fibre mieux que l'AST. Cependant, il est influencé par la technique de segmentation car il mesure le petit diamètre dans la cellule musculaire (Meng et al., 2014).

D'autres outils graphiques et des méthode analytiques pourraient être utilisés pour compléter les études de biopsie musculaire afin de mesurer le diamètre et la surface de la fibre musculaire à partir du potentiel d'action enregistré lors des examens électromyographiques à

fibre unique pour calculer la force spécifique des fibres (Frontera et al., 2010 ; Zalewska et al., 2012).

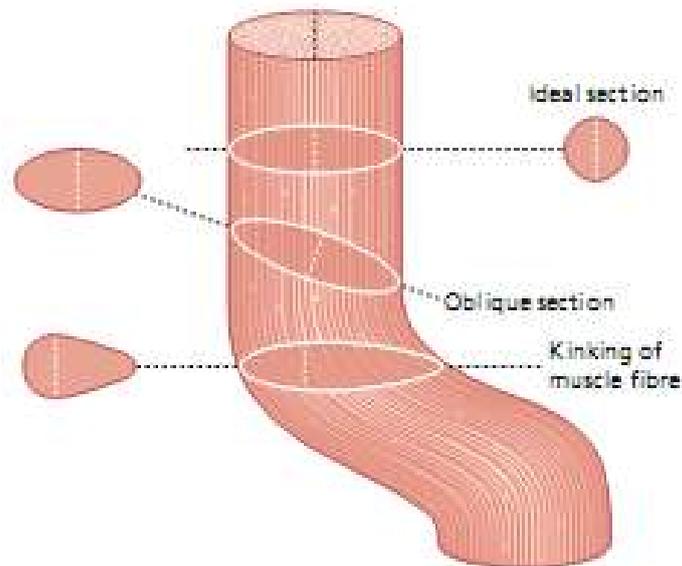


Figure 4: Schéma montrant l'importance de mesurer le petit diamètre de chaque fibre. C'est la seule mesure non altérée par la section oblique ou le vrillage des fibres (Dubowitz et al., 2013).

VI.1 Facteurs qui influencent le diamètre moyen de Feret (DMF) des fibres musculaires

En général, le diamètre des fibres varie de 10 à 100 μm mais dépend de facteurs tels que la santé, l'espèce, la race, le sexe, l'âge et le plan de nutrition (Choi & Kim, 2009), ajoutant à ça la forme des muscles et la sélection génétique :

VI.1.1 Morphologie du muscle

Les muscles striés squelettiques sont classés selon l'agencement des constituants en muscles fusiforme, penné, semi penné et multi penné (Barone, 2000), tous conçus pour maximiser l'efficacité de certaines fonctions mécaniques. Non seulement la forme externe, mais aussi l'architecture interne d'un muscle ont un effet profond sur la quantité et la direction de la tension développée par les fibres musculaires en contraction (Bruce & Carlson, 2019). Le muscle penniforme a des fibres plus courtes et font un angle avec le grand axe du muscle, il génère plus de force musculaire globale, en raison de ce qu'on appelle la surface de section physiologique, qui est mesurée perpendiculairement à l'axe des fibres musculaires, et non à l'axe longitudinal du muscle entier (Figure 4). Ainsi, si deux muscles avaient une surface de

section égale, un muscle penné serait plus fort qu'un muscle à fibres parallèles en raison de sa plus grande surface de section physiologique (Bruce & Carlson, 2019).

Selon Bruce et al. (1997) la force musculaire totale est proportionnelle à la section transversale, Krivickas et al. (2011) ont dit que la force spécifique musculaire entière est étroitement liée à la force spécifique de la fibre musculaire, cette force peut être normalisée au diamètre de fibre (Zalewska et al., 2012) plutôt qu'à la section transversale. Beaucoup de difficultés tiennent debout devant l'étude de la force spécifique d'un muscle in vivo comme la pennation des fibres intramusculaires, la présence de tissu conjonctif intramusculaire, des différences dans l'effet de levier mécanique lié à la position de l'articulation, la coactivation possible des muscles antagonistes lors des tests de force et la variation des schémas de recrutement des unités motrices (Bruce & Carlson, 2019), de la pulsion centrale et de la motivation du sujet (Krivickas et al., 2011). Donc la préparation de fibres musculaires à peau unique chimiquement est devenue de plus en plus populaire pour étudier les propriétés contractiles des muscles au niveau cellulaire et comment elles sont affectées par le vieillissement et la maladie (Trappe et al., 2003 ; Malisoux et al., 2007).

Afin de n'est pas calculer des valeurs aberrantes pour les paramètres morphométriques des fibres musculaires (nombre, AST et DMF.), le choix du muscle à étudié et la connaissance préalable de sa morphologie est très indispensable pour avoir des valeurs réelles de ses paramètres qui doivent être calculés après la réalisation des coupes perpendiculaire à l'axe longitudinal des fibres musculaires (Figure 05 et 06). La taille moyenne des fibres varie d'un muscle à l'autre chez la même espèce et dans le même âge (Papinah et al., 1996 ; Berri et al., 2002 ; GEYİKOĞLU et al., 2005 ; Cotrel, 2004). Papinah et al. (1996) ont trouvé que le diamètre moyen des cellules musculaires à J37 est différent entre les muscles du bréchet et ceux de la cuisse chez un poulet de chair de race Ross 208.

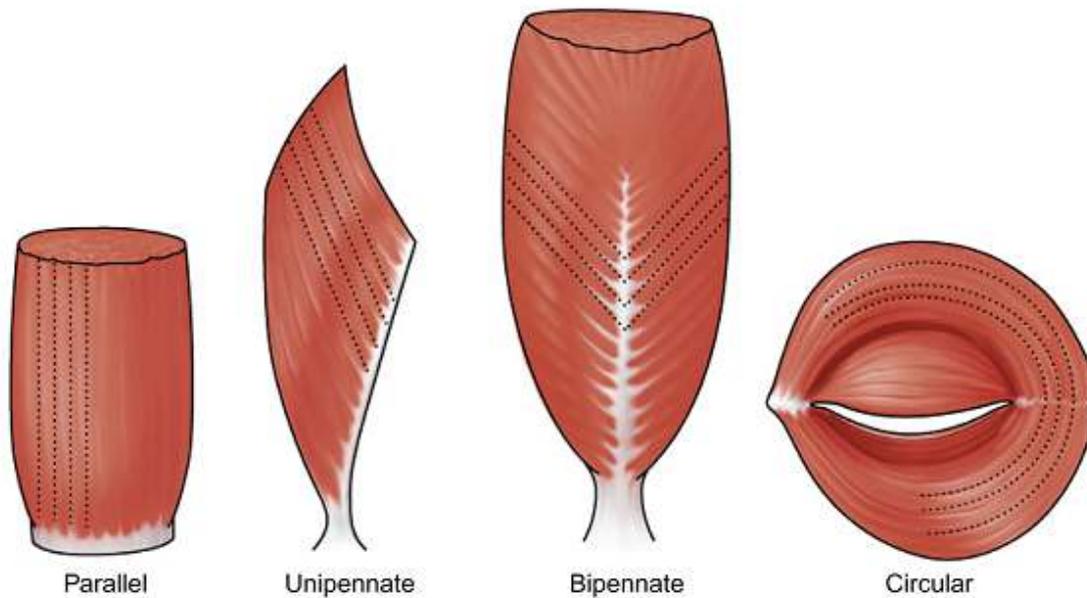


Figure 5: Types fondamentaux d'architecture interne dans les muscles squelettiques (Bruce & Carlson, 2019).

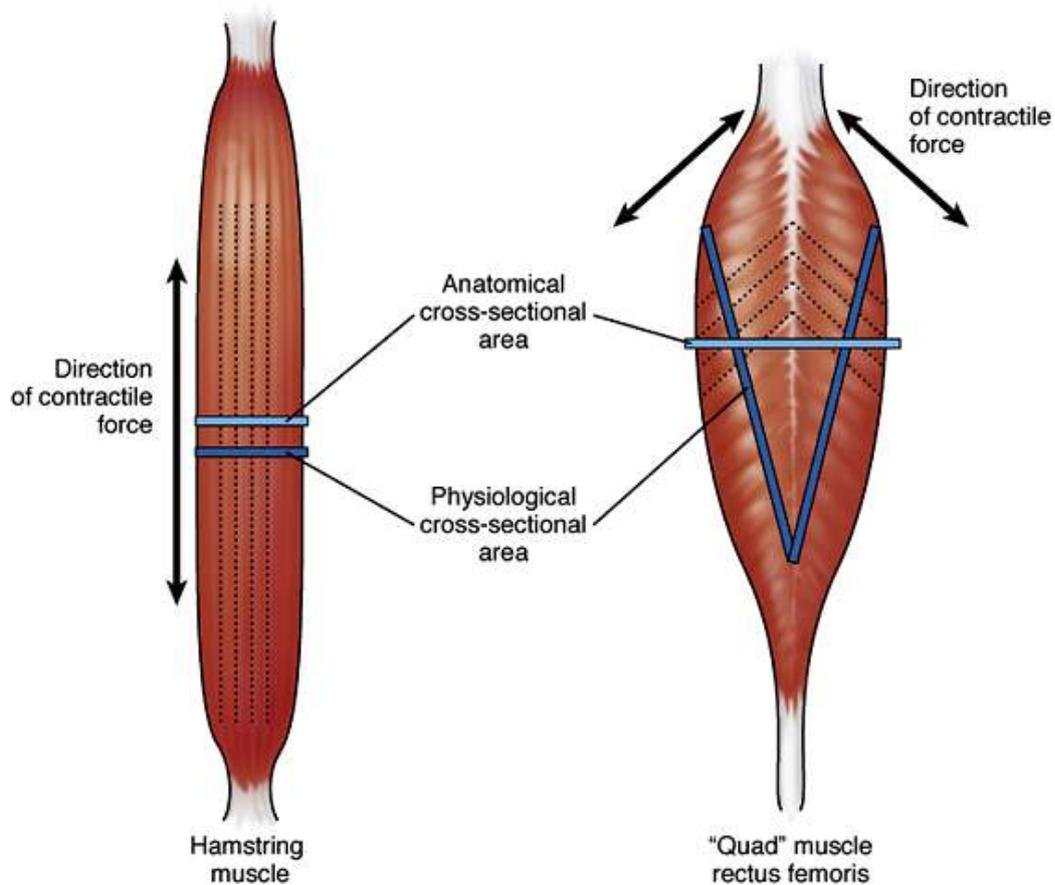


Figure 6: Architecture fonctionnelle des muscles fléchisseurs (ischio-jambiers) par rapport aux muscles extenseurs (quadrilatères) de la cuisse humaine (Bruce & Carlson, 2019).

VI.1.2 Espèce

La taille et le poids corporel des vertébrés sont connus pour être remarquablement différents. Les différences de masse musculaire sont liées au nombre ou à la taille des fibres musculaires. Une collection de données montrant les diamètres des fibres musculaires des petits et grands animaux (volailles et mammifères) indique que les différences de taille corporelle ne sont pas suffisamment reflétées par des différences de taille des fibres musculaires. Les diamètres moyens varient entre les espèces d'environ 20 à 80 μm . Cependant, la comparaison entre un animal de grande taille et un autre de moyenne ou petite taille comme la baleine et le porc, fait intéressant, les fibres musculaires du longissimus les plus grosses ne proviennent pas de la baleine (55 μm) en tant que plus grand mammifère, mais du porc (72-85 μm), même constatations pour le daim « Fallow-Deer » (19 μm) et le poulet (20 μm) (Rehfeldt et al., 1999). Jimenez et Williams. (2014) dans étude ont aussi cité les diamètres moyens de fibres musculaires du muscle Ps de 32 oiseaux tropicaux et tempérés appariés phylogénétiquement. Ces oiseaux, et malgré leurs petites tailles par rapport au poulet de chair, ont un diamètre de fibres supérieur à celui du poulet de chair comme, White-tipped dove « 51.24 ± 1.94 », Mourning dove « $51,07 \pm 1.96$ », Eastern whip-poor-will « 46.33 ± 1.09 ».

VI.1.3 Race et sélection génétique

Le diamètre des fibres musculaires est plus grand chez les animaux à croissance rapide par rapport aux animaux à croissance lente et cela était confirmé par la quasi-totalité des travaux qui ont été effectués sur ces types de comparaison (Remignon et al., 1995 ; Berri et al., 2002 ; Cotrel, 2004 ; Dale zotte et al., 2005 ; Berri et al., 2006 ; Chen et al., 2007 ; Jaturasitha et al., 2008 ; Khoshoo et al., 2013 ; Jimenez & Williams, 2014 ; Koomkrong et al., 2015 ; Picard & Gagaoua, 2020 ; Huo et al., 2021). Citant comme exemple Dransfield et Sonnicksi (1999) ont signalé que les poulets mâles à croissance rapide avaient des fibres musculaires pectorales trois à cinq fois plus larges que les poulets à croissance lente.

Par contre Prentis et al. (1984) ont montré que la variation du poids musculaire du muscle iliotibialis lateralis entre les races était attribuable à des différences de diamètre des fibres. En revanche, pour le muscle de Ps, cette variation était due à un nombre différent de fibres.

Berri et al. (2000) quant à eux aussi, dans une étude sur la viande de poitrine de poulet, ont constaté que la sélection visant à augmenter la masse musculaire n'avait aucun effet sur le

type de fibres, leur diamètre, ou la qualité de la viande. Tandis que chez les dindes, l'amélioration de la croissance et du rendement de la viande qui est basée sur une augmentation de la taille de la fibre a donné une qualité de viande détériorée.

VI.1.4 Sexe

Des recherches ont supposé que les mâles et les femelles avaient le même diamètre de fibres musculaires ; Smith et Fletcher (1988) ont constaté que les poulets mâles étaient significativement plus lourds que les femelles du même âge, mais qu'il n'y avait pas de tendance constante dans le diamètre des fibres musculaires en fonction du sexe. Alors que d'autres travaux ont confirmé que le diamètre moyen des fibres est plus grand chez les femelles que chez les mâles ; fait intéressant, malgré leur poids supérieur, les mâles présentaient des fibres musculaires plus petites que les femelles. Cela suggère un plus grand nombre de fibres musculaires chez les poulets de chair mâles (Scheurman et al., 2004). Dransfield et Sosnicki (1999) ont dit que des diamètres de fibres plus petites peuvent permettre une densité de tassement fibrillaire plus élevée. Scheurman et al. (2004) ont signalé que le poulet de chair mâle avait une plus grande densité de fibres musculaires dans le muscle pectoral que le poulet de chair femelle et cela pourrait être dû au fait que la masse musculaire est principalement influencée par le nombre total des fibres (TNF) qui est compensée par une augmentation du diamètre des fibres chez les femelles.

VI.1.5 Age

Il est bien connu que le nombre de myofibres chez les poulets est établi avant l'éclosion. Ainsi, toute augmentation du poids musculaire après l'éclosion dépend de l'augmentation de la longueur et du diamètre des myofibres (Chen et al., 2007). Le diamètre moyen des fibres est augmenté progressivement avec l'âge (Dransfield & Sosnicki, 1999). Selon Smith et Fletcher (1988) il semble que les diamètres des fibres musculaires sont plus influencés par l'âge que par la taille du corps. Toutes les recherches réalisées jusqu'à présent ont confirmé l'augmentation du diamètre des fibres avec l'âge (Gille et al., 1998 ; Chen et al., 2007).

VI.1.6 Etat de santé

La restriction de l'alimentation en quantité et en qualité entraîne une diminution du diamètre des fibres musculaires (Rehfeldt et al., 2004). Selon Tůmová et Teimouri (2009) la malnutrition postnatale à induire une perte de fibres musculaires qui semble dépendre à la fois

de l'intensité et de la durée de la restriction alimentaire, une restriction sévère semble provoquer une perte de fibres, alors qu'une dénutrition modérée affecte exclusivement l'hypertrophie des fibres par une réduction de l'accumulation nucléaire et protéique. En d'autres termes, un retard de croissance musculaire postnatale du muscle gastrocnémien à court terme chez les poulets de chair causé par une restriction alimentaire peut induire une hypertrophie des myofibres à long terme (Li et al., 2007).

VI.2 Relation entre le diamètre moyen de Feret (DMF) et le nombre total des fibres musculaires (nbFT)

Certains chercheurs ont confirmé que l'augmentation de la masse musculaire chez les animaux de croissance rapide est due à une élévation du diamètre moyen des fibres et non au nombre de fibres ; Aberle et Stewart (1983) ont étudié les caractéristiques des fibres musculaires de poulets à griller et de poulets pondeurs âgés de 3 à 11 semaines, les myofibres des muscles des poulets de chair avaient un diamètre transversal supérieur à ceux de la souche pondeuse. Prentis et al. (1984) ; Horak et al. (1989) quant eux n'ont pas observé cette différence numérique en comparant les muscles PLD et ALD chez quatre souches de poules pondeuses et poulet de chair. Les ressources bibliographiques concernant l'évolution du diamètre moyen des fibres sont minimales, les données disponibles sur le diamètre moyen des fibres des trois muscles du poulet qui nous ont intéressés pour notre travail sont récapitulées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3: Valeurs moyennes des poids des poulets et le DMF des fibres des muscles (Ps, ALD et Sart) cités dans la bibliographie

Auteurs	Race ou souche	Age	Poids vif (g)	Muscle	IIB (µm)	I (µm)	IIA (µm)	IIB (µm)	IIA (µm)	IIIA (µm)	IIIB (µm)
Smith et Fletcher (1988)	Peterson-Arbor Acre (croissance rapide)	55 J		Ps	43-59						
Papapinaho et al. (1996)	Poulets mixtes Ross 208	37J		Ps	59,7						
Miraglia et al. (2006)	Kabir (croissance intermédiaire)	87J	252,4	Ps	54,2						
	Ross (croissance rapide)	54J	858,6	Ps	69,4						
Chen et al. (2007)	Arbor acre (croissance rapide)	J1		Ps	8.40						
		J14		Ps	24.19						
		J28		Ps	32.01						
		42J	1517	Ps	40.69						
		56J	2614	Ps	47.25						
Franco et al. (2012)	Cobb broiler (reproducteur chair)	21J	747,85	Ps	33,95						
Koomkrong et al. (2015)	Arbor Acres (croissance rapide)	45J	2156,28	Ps	52,31						
	Poulets indigènes thaïlandais (croissance lente)	112J	1394.80	Ps	33,31						
Dragan Žikić et al. (2016) Pas de différence sig ds le diamètre	Banat naked neck (croissance lente)	12S		Ps	51.41						
	Sombor crested (croissance lente)	12S		Ps	55.14						
	Red-bro (croissance moyenne)	9S		Ps	50.62						
Huo et al. (2022)	Ross 308	J0 post éclosion	43,3	Ps	6,6						

VII. COEFFICIENT DE VARIABILITE

En plus du diamètre moyen des fibres, il est important d'évaluer la variabilité. Un chiffre utile qui est le coefficient de variabilité, calculé comme suit : Standard de déviation x 1000/diamètre moyen de fibres. Dans le muscle normal, le coefficient de variabilité est inférieur à 250 et tout échantillon ayant un coefficient de variabilité supérieur à celui-ci est considéré comme démontrant une variabilité anormale de la taille des fibres. Chez l'enfant, il faut tenir compte de l'augmentation progressive de la taille avec l'âge (Dubowitz et al., 2013).

VIII. PERIMETRE

Il est beaucoup moins utilisé par la communauté de chercheurs par rapport à l'AST ou DMF puisqu'il est très influencé par la technique de segmentation.

IX. RELATION ENTRE LES CARACTERISTIQUES DE LA FIBRE MUSCULAIRE ET LA QUALITE DE LA VIANDE

Relever le défi d'optimiser l'efficacité de la croissance musculaire et la qualité de la viande nécessite une compréhension approfondie des processus impliqués dans le développement des fibres musculaires et la diversification des espèces productrices de viande (Picard et al., 2002). Ces dernières années de nombreuses recherches ont été lancées pour vérifier la corrélation entre la qualité de la viande et les propriétés biochimiques et histologiques des fibres musculaires. Les chercheurs ont été divisés en deux groupes concernant l'effet de la taille de la fibre sur la qualité de la viande : le premier a confirmé que l'augmentation de la taille de la fibre avec l'âge, avec ou sans l'effet de la sélection génétique, conduit soit à une viande dure à la mastication (Chen et al., 2007 ; Zhao et al., 2011), soit à une chair contenant des fibres géantes responsables de l'hypercontraction (Chiang et al., 1995 ; Sosnicki et al., 1998 ; Miraglia et al., 2006), soit à une viande sombre avec un pH très élevé (Berri et al., 2007). En revanche, les scientifiques du deuxième groupe ont constaté que les viandes avec des fibres grandes seraient donc mieux adaptées aux processus de transformations (pH élevé, viande tendre et moins sombre) par rapport aux viandes avec de petites fibres (Duclos et al., 2007, Choi & Kim, 2009 ; Bünger et al., 2009).

Le type et les caractéristiques des fibres musculaires ont aussi un effet sur la qualité de la viande comme la tendreté et la saveur selon certains chercheurs. Une corrélation négative

entre la section transversale des fibres et la tendreté a été rapportée chez les porcs et les bovins (Renand et al., 2001). Ryu et al. (2008) ont conclu que la composition des fibres musculaires peut expliquer en partie la variation de la qualité de la viande entre et au sein des races des porcs. Une valeur de pH élevée chez les porcs Berkshire est due à un pourcentage élevé de fibres de type I et à un faible pourcentage de fibres de type IIb. Les muscles oxydatifs contiennent généralement des niveaux plus élevés de lipides en faveur d'une meilleure saveur comme chez le mouton (Valin, 1998). Plus d'informations sont nécessaires pour évaluer les caractères affectant la qualité de la viande. Des études futures sont nécessaires pour déterminer le rôle d'autres composants musculaires comme le tissu conjonctif intramusculaire et les adipocytes (Verdiglione & Cassandro, 2013).

X. TRAITEMENT D'IMAGE DU TISSU MUSCULAIRE

Un bon traitement de l'image du tissu musculaire pourrait ainsi être obtenu par trois principaux déterminants : une meilleure acquisition de l'image, une parfaite segmentation et une adéquate mise en évidence des différents types de fibres musculaires.

X.1 Acquisition des images

Différents grossissements ont été utilisés par les scientifiques du muscle, le plus fréquemment utilisé est le grossissement x20 (Liu et al., 2013 ; Kim et al., 2007) les autres grossissements sont moins utilisés : le grossissement x10 (Meunier et al., 2010 ; Wicke et al., 2007 ; Franco et al., 2012 ; Markus et al., 2014), le grossissement x5 (Sertel et al., 2011) et le grossissement x4 (Garton et al. 2010). Néanmoins, les chercheurs n'arrivent pas à capturer toute la surface d'une coupe colorée, qui peut être elle-même la surface totale d'un muscle, avec une seule capture d'image ce qui a obligé certains d'eux comme Garton et al., (2010) à faire plusieurs images, de faible grossissement (x4), couvrant toute la surface du muscle puis les assembler pour former un montage d'une image complète à l'aide de Photoshop. De l'autre côté, il existe, dans certains muscles, une variabilité régionale considérable concernant la taille des fibres, de sorte que la mesure ou l'échantillonnage de seulement quelques petites zones ne fournira pas nécessairement des mesures représentatives (Liu et al., 2013).

Les deux dernières décennies connaissent l'émergence des scanners des lames qui numérisent les lames portant des coupes colorées par des réactions histoenzymologiques (Ameisen et al., 2012 ; Kummel et al., 2012). Ce développement qu'a connu le domaine de la bio-informatique qui évolue vite et acquiert rapidement de solides lettres de noblesse devra

envoyer, selon le site Réflexions (site de vulgarisation de l'Université de Liège., 2014), le microscope au placard et la microscopie classique sera oubliée par les prochaines générations.

X.2 La segmentation

La segmentation des images du tissu musculaire en fibres distinctes n'est pas facile et les techniques simples de seuillage ou de morphologie ont une grande difficulté à séparer les fibres étroitement apposées (Dryden et al., 2006 ; Garton et al., 2010 ; Liu et al., 2013). Ces techniques qui sont, en général, des méthodes manuelles utilisées depuis 40 à 50 ans incluent le traçage manuel des cellules ou l'utilisation d'un outil d'édition d'image à usage général (Janssens et al., 2013 ; Kostrominova et al., 2013 ; Lei et al., 2019) ; elles sont, par conséquent, extrêmement longues, coûteuses, contiennent de grandes variations entre observateurs et ne permettent pas de séparer avec précision les amas de cellules complexes qui apparaissent généralement dans les tissus musculaires (Kostrominova et al., 2013).

Pour surmonter ces limitations, les chercheurs utilisent des méthodes semi-automatiques et automatiques plus efficaces qui exploitent de manière précise les frontières entre les fibres musculaires, fournissant ainsi des informations plus discriminantes. Les approches courantes pour la segmentation automatisée des sections transversales des fibres musculaires vont de simples stratégies basées sur le seuillage à des méthodes plus avancées, notamment le contour actif et les algorithmes basés sur les bassins versants (Stevens et al., 2020). Les outils de segmentation d'images musculaires sont classés selon différents critères (degré d'automatisation, outil universel ou spécialisé, type de l'image traitée, l'algorithme utilisé « technique de traitement d'image » et les critiques qu'a reçu le logiciel) en :

X.2.1 Logiciels semi-automatiques

Les outils semi-automatiques, qui sont encore largement utilisées dans les recherches sur les muscles squelettiques, nécessitent toujours un traitement préalable ; l'opérateur doit interagir manuellement avec l'ordinateur, à l'aide d'un stylo numériseur ou une souris d'ordinateur, pour supprimer les artefacts et les tissus non pertinents et tracer les contours des fibres musculaires non segmentées (Mayachitra, 2006). Cette interaction de l'utilisateur rend l'analyse d'un grand nombre d'images fastidieuse et peu pratique (Janssens et al., 2013). Ces logiciels peuvent être classés en logiciels universels et spécialisés.

X.2.1.1 Logiciels semi-automatiques universels

Wiesmann et al. (2014) ont développé un catalogue de critères pour évaluer 15 logiciels libres basés sur Matlab et ImageJ pour la segmentation et l'analyse des micrographies cellulaires en fonction des exigences structurelles, de la fonctionnalité et de la convivialité; d'après ce catalogue, ils ont pu classer ImageJ/Fiji et CellProfiler parmi les premiers logiciels en termes de segmentation. Par contre, dans une étude comparative de Janssens et al. (2013), CellProfiler (Carpenter et al., 2006) a été classé le dernier dans la segmentation du tissu musculaire par rapport à son logiciel (Charisma) et deux autres logiciels Wang classes 2 et 3 (Wang et al., 2012). Cette étude et une autre de Lei et al. (2019) ont confirmé que CellProfiler ne permet pas de gérer correctement les agrégats cellulaires complexes, les artefacts d'imagerie, les tissus non pertinents, et les cellules dégradées.

Selon Kostrominova et al. (2013) ; Wiesmann et al. (2014) le logiciel le plus utilisé actuellement est Image J de National Institutes of Health (NIH USA), puisque la communauté d'utilisateurs est vaste et en croissance, beaucoup de scientifiques développent leurs propres plugins. Ainsi, Schneider et al. (2012) ont développé la version Fiji avec un menu plus étendu, des mises à jour automatiques et des méthodes variées d'analyse d'images et de segmentation cellulaire pour faciliter l'utilisation d'ImageJ. Signalons ici que d'autres analyseurs d'images semi-automatisés similaires comme Image-Pro de Media Cybernetics et MetaMorph sont fréquemment utilisés dans l'étude du muscle. (Kostrominova et al., 2013). La structure de menu des Fiji est plus étendue que celle d'ImageJ, car elle intègre des méthodes supplémentaires.

X. 2. 1. 2. Logiciels semi-automatiques spécialisés

Ce groupe de logiciels utilise des approches plus avancées qui peuvent être divisées, selon Strange et al. (2014) en :

- Méthodes de détection de bord (détection de crête) utilisant la détection de bord pour identifier le périnysium ou l'endomysium (limites des myofibres) ;
- Méthodes utilisant des modèles déformables pour identifier les myofibres, tels que les contours actifs.

X.2.2 Logiciels automatiques spécialisés

L'automatisation complète de l'analyse histologique des images musculaires joue un rôle clé dans l'avancement des techniques de recherche. Mais cette approche nécessite des conditions indispensables comme le coût, la disponibilité et la vérification de l'exactitude des

mesures. De nombreuses études rapportent ces dernières à l'aide de méthodes de quantification automatisées fournies par des logiciels d'imagerie exclusifs. Malheureusement, bien que plusieurs approches de traitement d'images pour l'analyse des coupes musculaires aient été décrites dans la littérature, à ce jour, seul un nombre limité de groupes de recherche ont rendu leur code informatique disponible pour une utilisation générale par la communauté de recherche (Stevens et al., 2020).

X.3 Mise en évidence des différents types de fibres musculaires

Différents algorithmes ont été développés par les chercheurs en biomédecine et les ingénieurs de logiciels pour le typage des différents types de fibres musculaires. Ils ont commencé avec la méthode de spectro-photo-microscopie qui mesure la densité optique des fibres (Bye et al., 1989), puis sont apparus des outils interactifs utilisant des caméras vidéo CCD en mode vidéo direct, connectées au microscope pour classifier les fibres en fonction des niveaux de gris des cellules musculaires (Buche & Mauron, 1996). Ensuite, il y a eu l'émergence d'outils automatiques qui classent les fibres en superposant les différentes coupes sériées colorées différemment sur une image de référence (Kostrominova et al., 2013), en utilisant des logiciels qui déterminent la densitométrie des fibres, comme celui utilisé par Meunier et al. (2010).

Notons que ces derniers ont des difficultés de la classification de toutes les cellules musculaires surtout dans les coupes où les fibres musculaires ne sont pas parallèles entre elles ou elles changent de forme à travers une grande série de sections, ou si certaines fibres disparaissent de la section ou se divisent. Ces aspects font l'objet de notre travail expérimental et sont déjà prouvés par les travaux de Karen et al. (2009).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. ÉTUDE MORPHOMETRIQUE

I.1 Matériel

I.1.1 Les animaux

L'ensemble des travaux porte sur l'analyse des effets de la croissance sur le développement musculaire du poulet de chair (*Gallus gallus domesticus*). Les expériences ont été réalisées sur des poulets appartenant à une race de type chair à croissance rapide (Hubbard F-15). Les 220 poussins de l'expérience ont été élevés au sol dans un bâtiment, dans de bonnes conditions d'élevage (alimentation appropriée, abreuvement *ad libitum*, suivi sanitaire).

Le poulailler est implanté à la commune de TAXLENT. Les poussins sont pesés et identifiés individuellement dès leur arrivage avec des boucles dans les pieds, les poids des poussins et la consommation journalière sont calculés quotidiennement à 18:00 h et ont reçu *ad libitum* un aliment granulé dont le taux d'incorporation dans 100 Kg de ses composants sont inclus dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Composition de l'aliment destiné aux animaux pendant la période d'élevage.

Composants	Aliment de démarrage (J1 – J28) (%)	Aliment de croissance (J28 – J56) (%)
Maïs	63	65
Soja	29	27
Gros son	5	5
Phosphate	1	1
Calcaire	1	1
CMV	1	1

I.1.2 Instruments

Pour la réalisation de ce travail, le matériel suivant a été utilisé :

- Balance électronique (ACS-L), max : 30 kg (AC power supply : 220V/50Hz).
- Balance électronique de précision avec trois chiffres après la virgule et qui porte la désignation suivante :

- Type : OHAUS.
- Modèle : GT410.
- Power requirements 50/60Hz 20A.
- Pied à coulisse électronique (G.T. TOOLS, 0-200mm/8''×0,01).
- Loupe.
- Trousse de dissection (porte lames, lames de Bistouri, pinces, ciseaux, couteaux).

I.2 Méthodes

I.2.1 Préparation des muscles à la dissection

Dix sujets cliniquement sains subissant un jeûne de douze heures (de 18 : 00 h du soir à 6 : 00 h du matin) ont été choisis au hasard de chaque âge étudié qui sont respectivement J0, J7, J14, J21, J28, J35, J42, J49 et J56. Pour chaque sujet, trois muscles (Ps, ALD et Sart) du côté gauche ont été isolés. Les mêmes muscles du membre controlatéral ont été isolés et conservés comme réserve.

II. ÉTUDE HISTOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE DES MUSCLES ETUDIÉS

Notre travail a porté sur l'étude de la morphométrie et la typologie de la cellule musculaire chez une souche de poulet de chair dans trois muscles typologiquement différents. Cent vingt poussins élevés dans les mêmes conditions, l'étude a été réalisée sur 90 sujets de poulet de chair de race ISA (Hubbard F-15) de croissance rapide à raison de 10 sujets sélectionnés au hasard pour chaque âge étudié (J0, J7, J14, J21, J28, J35, J42, J49 et J56).

II.1 Prélèvement des échantillons

II.1.1 Matériel

- Cryostat (SLEE).
- BT de stockage d'azote liquide.
- Congélateur (-80°C).
- Boîtes de conservation des lames.

II.1.2 Calcul du poids vif et du taux de croissance

L'évolution du taux de croissance des animaux d'un stade d'âge à l'autre a été mesuré selon la formule suivante : $[(X2-X1)/X1] \times 100$.

X1 : poids relatif de l'animal au stade d'âge n.

X2 : poids relatif de l'animal au stade d'âge n+1.

II.1.3 Isolement et stockage des fragments destinés à l'étude histologique

Cette étude a été réalisée sur des poulets appartenant aux âges post éclosion : J0, J7, J14, J21, J28, J35, J42, J49 et J56, à raison de 10 sujets pour chaque âge étudié. Les trois muscles à étudier ont été récupérés de la partie gauche de la carcasse de chaque sujet. Un fragment a été récupéré ensuite de chacun des trois muscles et collé sur un morceau de liège avec deux aiguilles sur les deux extrémités en les immergeant pendant 30 secondes dans un bain de Méthybutane (Isopentane) refroidi à l'azote liquide. Ils sont ensuite recouverts par un bout d'aluminium, identifiés, déplacés et conservés au congélateur à -80°C jusqu'au moment de réalisation des coupes. Les mêmes fragments ont été récupérés aussi à partir du côté droit comme réserve. Chacun des fragments musculaires des muscles étudiés est isolé comme suit :

II.1.3.1 Pectoral Superficiel (Ps)

Pour le muscle Ps les fragments ont été récupérés à partir de l'endroit illustré dans l'image en suivant la technique décrite par Scheuermann et al. (2004) (Figure 07) :

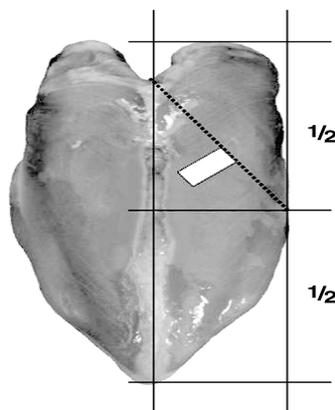


Figure 7 : Endroit de prélèvement du fragment (rectangle blanc) destiné à l'étude histochimique pour le muscle Pectoral Superficiel (Ps) selon la technique décrite par Scheuermann et al. (2004).

II.1.3.2 Antérieur Latissimus Dorsi (ALD)

Des fragments musculaires ont été isolés dans la mi-longueur du muscle ALD (Figure 08).

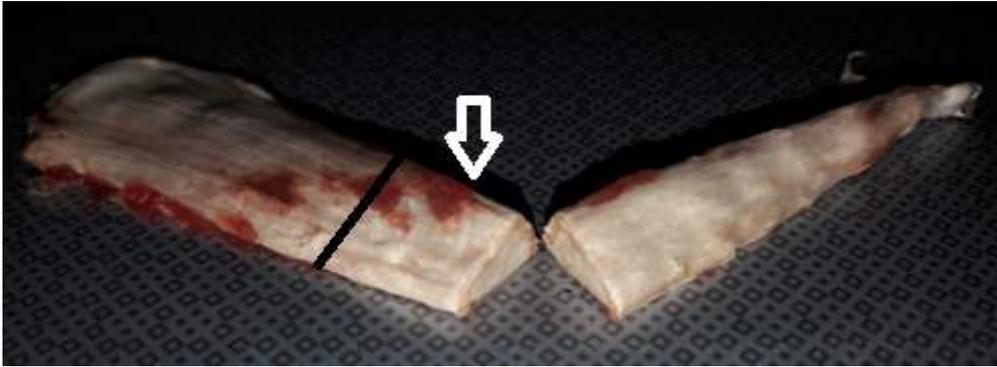


Figure 8 : Endroit de prélèvement du fragment destiné à l'étude histochimique pour le muscle Antérieur Latissimus Dorsi (ALD) qui est dans la demi-longueur du muscle (Image personnelle).

II.1.3.3 Sartorius (Sart)

Les fragments musculaires ont été isolés dans la mi-longueur du muscle Sart (Figure 09).



Figure 9 : Endroit de prélèvement du fragment destiné à l'étude histochimique a été montré par une flèche noire dans la moitié distale du muscle Sartorius (Image personnelle).

II.2 Réalisation des coupes histologiques et préparation des lames

Les fragments des trois muscles récupérés du congélateur (-80°C), déplacés dans l'azote liquide et laissés pendant au minimum 1 heure de temps au cryostat à -21°C. Pour chaque muscle, nous avons effectué plus de 3 coupes sériées de 10µm d'épaisseur montées sur des lames différentes ; pour toute la surface du muscle ALD (jusqu'à l'âge d'abattage) et Sart (jusqu'à l'âge de quatre semaines) et pour une petite surface du muscle Ps perpendiculairement à l'axe des fibres à l'aide d'un cryostat de marque (SLEE), Ces dernières sont laissées à sécher à température ambiante pendant 30 minutes.

II.3 Techniques de coloration

Ensuite, chaque lame est colorée à l'aide d'une coloration spécifique :

II.3.1 Coloration à l'azorubine

La coloration de l'azorubine est utilisée comme une lame de référence pour les autres lames colorées par les deux autres colorations histochimiques. Elle permet aussi l'étude des différents paramètres caractérisant la taille et la forme de la fibre selon un protocole de l'Unité de Recherche Avicole (URA) de l'Institut de Recherche Agronomique de Tours (INRA France).

II.3.2 Coloration histochimique

II.3.2.1 Révélation de l'activité ATPasique

La révélation de l'activité ATPasique des cellules musculaires a été réalisée selon le protocole portant le numéro d'identification 0083-MO-0190, approuvé le 24 janvier 2007 par l'Unité de Recherche Avicole (URA) de l'Institut de Recherche Agronomique de Tours (INRA France). Ce protocole s'est basé sur la classification d'Ashmore et Doerr (1971) ainsi que sur celle de Bernard et al. (1982).

II.3.2.2 Révélation de l'activité de la SDH (Succinate Déshydrogénase)

La mise en évidence de l'activité de la SDH sur des coupes transversales des trois muscles étudiés a été faite suivant le protocole qui porte le numéro d'identification 0083-MO-0110 de l'Unité de Recherche Avicole (URA) (INRA France) ; Cette coloration nous permettra

de distinguer les fibres présentant une forte activité oxydative de type I (β r) ou IIA (α r), caractérisées par une coloration bleue intense due à une densité élevée en mitochondries.

II.4 Prise et traitement d'images

II.4.1 Acquisition d'image

Cette étude a été réalisée sur des poulets appartenant aux âges post éclosion : J0, J7, J14, J21, J28, J35, J42, J49 et J56, à raison de 10 sujets pour chaque âge étudié. Pour chaque muscle, nous avons effectué 3 coupes séries montées sur 3 lames différentes. Une lame a été colorée par Azorubine et a servi comme lame de référence, la deuxième a été destinée pour révéler l'activité métabolique de l'enzyme Succinate Déshydrogénase et la troisième a été pré incubée dans une solution ATPasique à un Ph de 4,10 pour révéler l'activité contractile. Ces trois lames colorées ont été scannées complètement (lames virtuelles) au format Aperio-SVS avec un grossissement x40 par le groupe Cytoinformatics LLC avec un scanner de lames de marque Leica équipé d'un logiciel pour le traitement d'image version Aperio ImageScope (v12.3.2.8013), sauf pour les lames qui révèlent l'activité de la SDH du muscle Ps et ALD puisque toutes leurs fibres ont une réaction négative et positive respectivement avec cette coloration. Des images séries ont été sélectionnées à partir de ces lames scannées au format JPEG à raison d'une image série pour chaque muscle et pour chaque âge étudié :

II.4.1.1 Pectoral Superficiel (Ps)

Une seule image a été sélectionnée pour chaque sujet d'étude à partir de la lame d'Azorubine sans faire des images séries puisque les deux autres lames qui révèlent l'activité de la SDH et l'activité ATPasique ont une réaction négative (Figure 10).

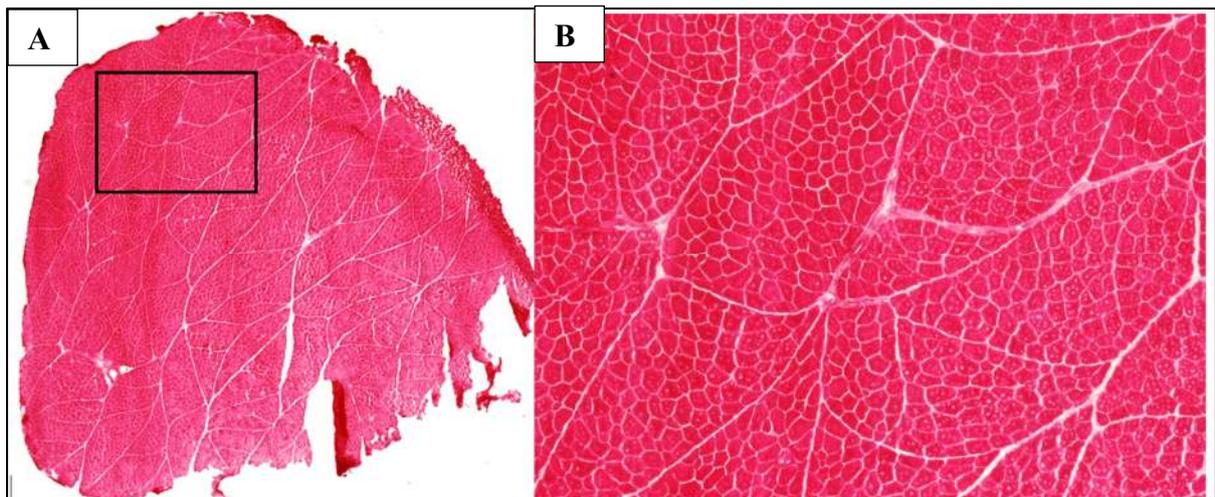


Figure 10: A- Sélection d'une image d'Azorubine à partir d'une lame virtuelle du muscle Ps d'un poulet âgé de 49 jours scannée par le groupe Cytoinformatics LLC au format Aperio-SVS. B : c'est la partie encadrée dans l'image A après extraction par Aperio ImageScope.

II.4.1.2 Sartorius (Sart)

Pour chaque poulet de l'étude, deux images sériées ont été prises à partir du muscle Sart à raison d'une image sériée pour chacune des deux parties du muscle Sart, l'une de la partie mixte (M) et l'autre de la partie rapide (R) comme illustré dans les Figures 11 et 12.

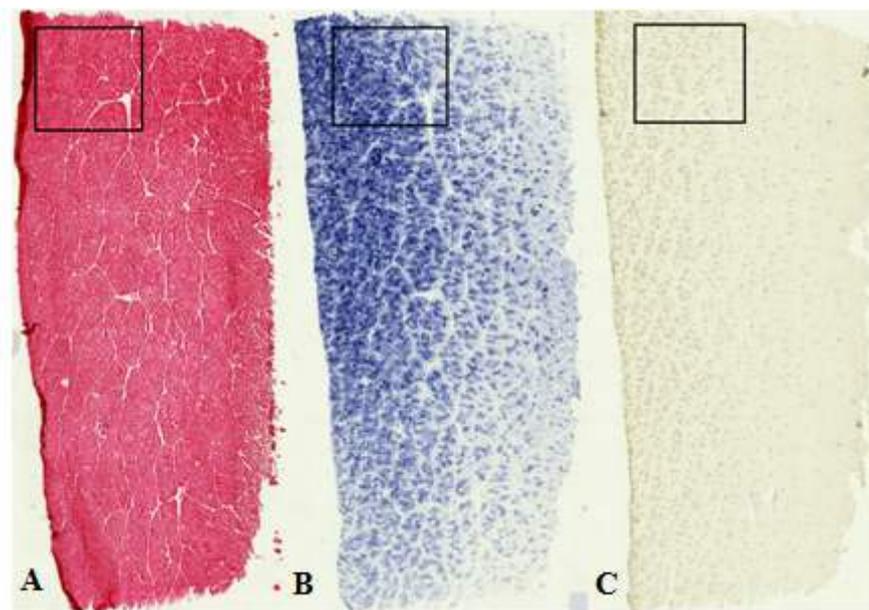


Figure 11: Sélection des images sériées à partir des lames virtuelles du muscle Sart d'un poulet âgé de 42 jours (partie mixte) scannées par le groupe Cytoinformatics LLC au format Aperio-SVS. A. coupe colorée à l'azorubine, B. coupe révélant l'activité SDH, C. coupe révélant l'activité ATPasique.

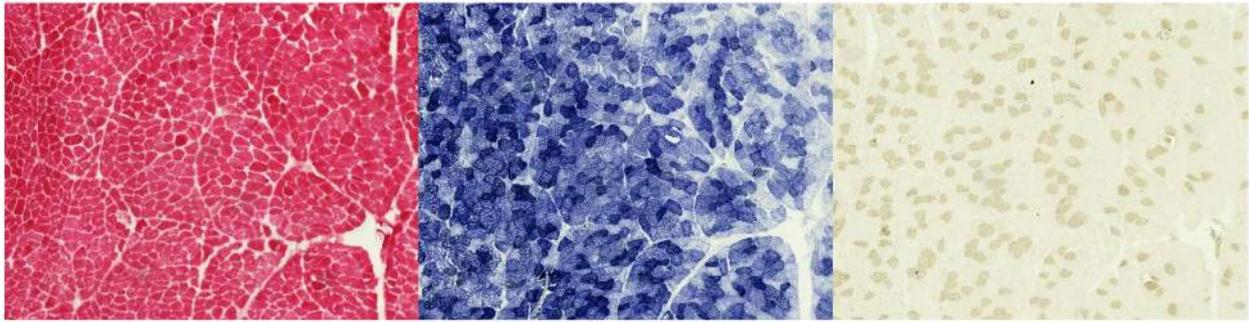


Figure 12: Une coupe sériée de la partie mixte du muscle Sart après extraction à partir des lames virtuelles (Figure 11). A. coupe colorée à l'azorubine, B. coupe révélant l'activité de la SDH, C. coupe révélant l'activité ATPasique.

II.4.1.3 Antérieur Latissimus Dorsi (ALD)

Une image sériée a été prêle à partir du muscle ALD pour chaque sujet d'étude comme illustré dans la Figure 13 et 14.

NB : la lame révélant l'activité de la SDH n'a pas été scannée puisque toutes les fibres ont une réaction positive avec cette enzyme.

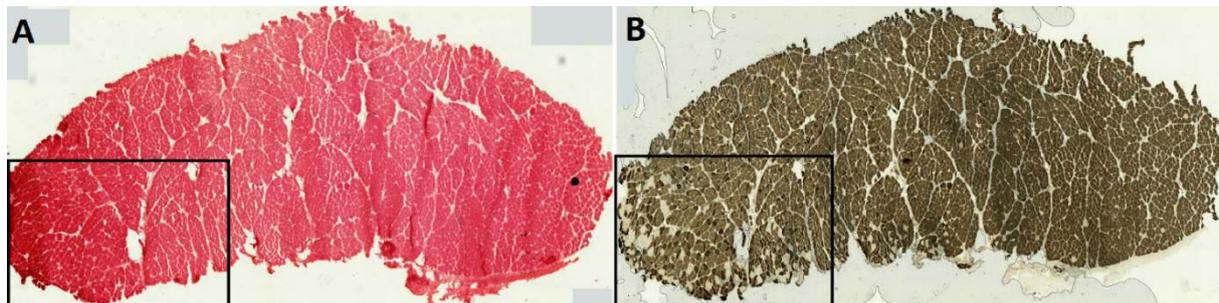


Figure 13: Sélection d'une image sériée à partir des lames virtuelles scannées du muscle ALD pour un poulet âgé de 49 jours par le groupe Cytoinformatics LLC au format Aperio-SVS. A. lame colorée à l'azorubine, B. lame révélant l'activité ATPasique.

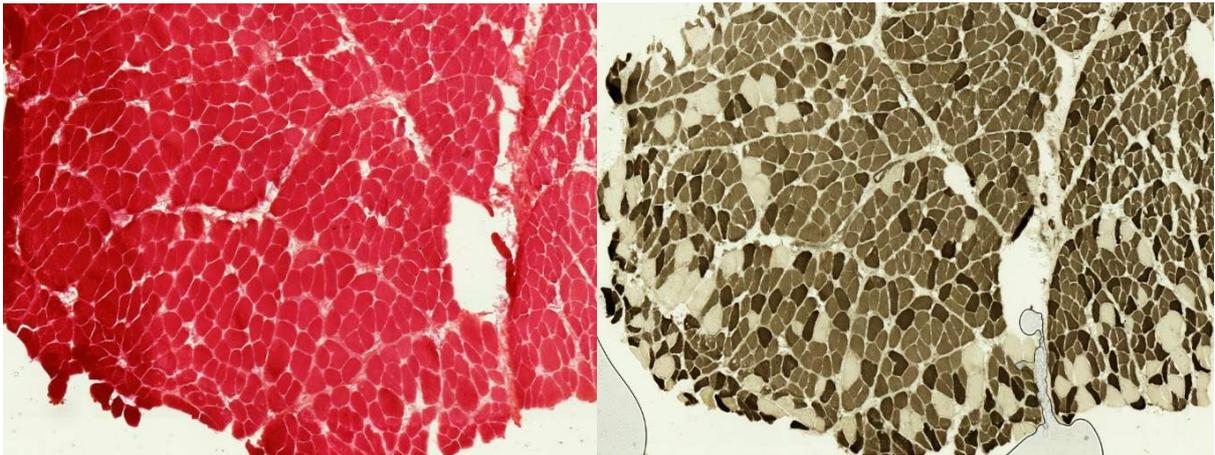


Figure 14: Une coupe série du muscle ALD au format JPEG après extraction à partir des lames virtuelles (Figure 13). A. coupe colorée à l'azorubine, B. coupe révélant l'activité ATPasique.

II.4.2 Segmentation

Toutes les images de la coloration Azorubine des trois muscles étudiés ont été segmentées par le groupe Cytoinformatics LLC (Université de Kentucky, USA). Nous avons procédé après à une étape de post-traitement de ces images segmentées par le logiciel ImageJ (Fiji) pour supprimer des éventuels artefacts, des tissus non pertinents et/ou des cellules musculaires juxtaposées (Figure 15).

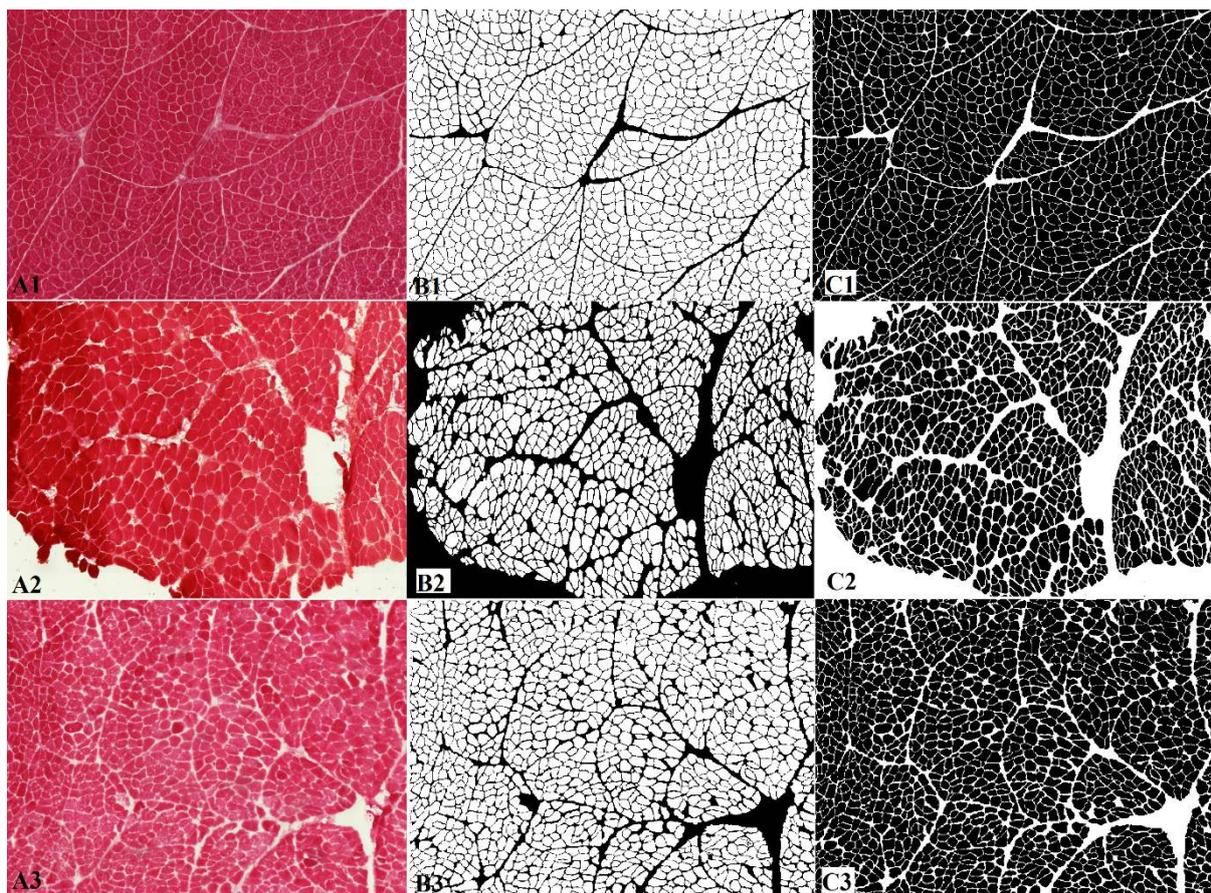


Figure 15: B1, B2 et B3 : Segmentation des images d'Azorubine (A1, A2 et A3) pour les muscles Ps, ALD et Sart M sélectionnées dans les Figures 10, 14 et 12 respectivement par le groupe Cytoinformatics LLC (B). C1, C2 et C3 : post-traitement des images B1, B2 et B3 par le logiciel ImageJ (Fiji) pour supprimer des éventuels artefacts, des tissus non pertinents et/ou des cellules musculaires juxtaposées.

II.4.3 Typologie :

Une fois que les images numériques des muscles entiers sont disponibles pour le muscle Sart et ALD jusqu'à 28 jours et l'âge d'abattage respectivement, ainsi qu'une partie du muscle Ps et Sart jusqu'à l'âge d'abattage, des paramètres morphométriques peuvent être mesurés (Nombre, AST, DMF, Coefficient de variabilité et périmètre). Ces images d'Azorubine segmentées pour les trois muscles ont été utilisées après comme des images de références pour la mise en évidence des différents types de fibres ainsi que le calcul de leurs paramètres structurels (Nombre, AST et DMF) à l'aide de l'outil Fiji "Add to Manager", comme suit :

II.4.3.1 Pectoral Superficiel (Ps)

Cette étape a été réalisée facilement pour ce muscle puisque 99% de ses fibres musculaires sont des fibres rapides de type IIB.

II.4.3.2 Sartorius (partie mixte et rapide)

L'image segmentée C3 de la Figure 15 a été utilisée pour la mise en évidence des fibres I, IIA et IIB ainsi que le calcul de leurs paramètres comme démontré dans la Figure 16 on se basant sur les deux images révélant les activités SDH et ATPasique.

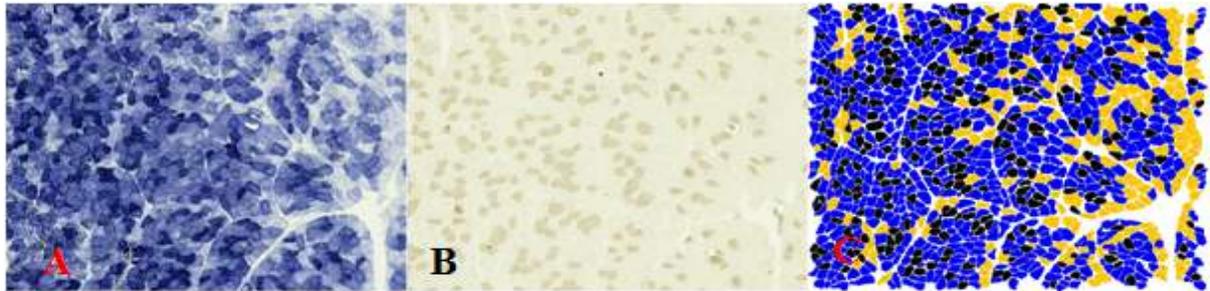


Figure 16: Sélection des fibres de type I sur l'image de référence (Figure 15, C3) à partir de l'image qui révèle l'activité ATPasique (B) puis les fibres de type IIA et IIB à partir de l'image qui révèle l'activité de l'enzyme SDH (A).

II.4.3.3 Antérieur Latissimus Dorsi (ALD)

La même méthode utilisée pour le typage des fibres des deux parties du muscle Sart a été suivi pour faire la mise en évidence des différents types de fibres du muscle ALD (IIA, IIIA et IIIB) (Figure 17) ; notant que l'image qui a révélée l'activité de la SDH n'a pas été exploitée à cause de la réaction positive de toutes les cellules musculaires du muscle ALD avec cette coloration. Nous avons discuté en détail les points d'acquisition d'image et de segmentation dans le chapitre III.

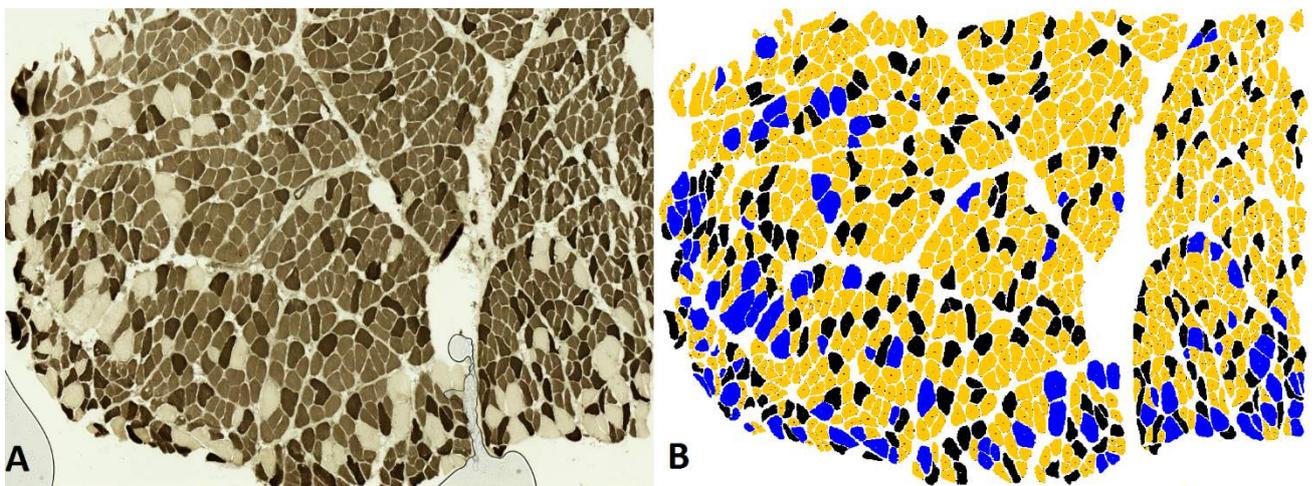


Figure 17: Sélection des différents types de fibres IIIA (orange), IIIB (noir) et IIA (bleue) sur l'image de référence (Figure 15, C2) à partir de l'image qui révèle l'activité ATPasique (A).

III. ÉTUDE COMPARATIVE ENTRE TROIS LOGICIELS DE TRAITEMENT D'IMAGE (2 SEMI-AUTOMATIQUE ET 1 AUTOMATIQUE)

III.1 Acquisition des images

63 images d'Azorubine du muscle ALD ont été choisies à partir de 90 images segmentées par le groupe Cytoinformatics, à raison de 7 images par âge. Dans les mêmes endroits des lames où ces 63 images ont été sélectionnées et segmentées, des images d'Azorubine ont été aussi capturées avec des grossissements x10, x20, x25, x40 par un microscope Optika équipé d'une caméra intégrée de marque Rising Technology avec une résolution de 18MP. Le comptage des cellules musculaires existantes dans chacune de ces images a été faite par l'application de CellCounter du logiciel Fiji (Figure 18), et les résultats ont été comparés avec ceux obtenus à partir des images segmentées par Cytoinformatics LLC (Figure 18).

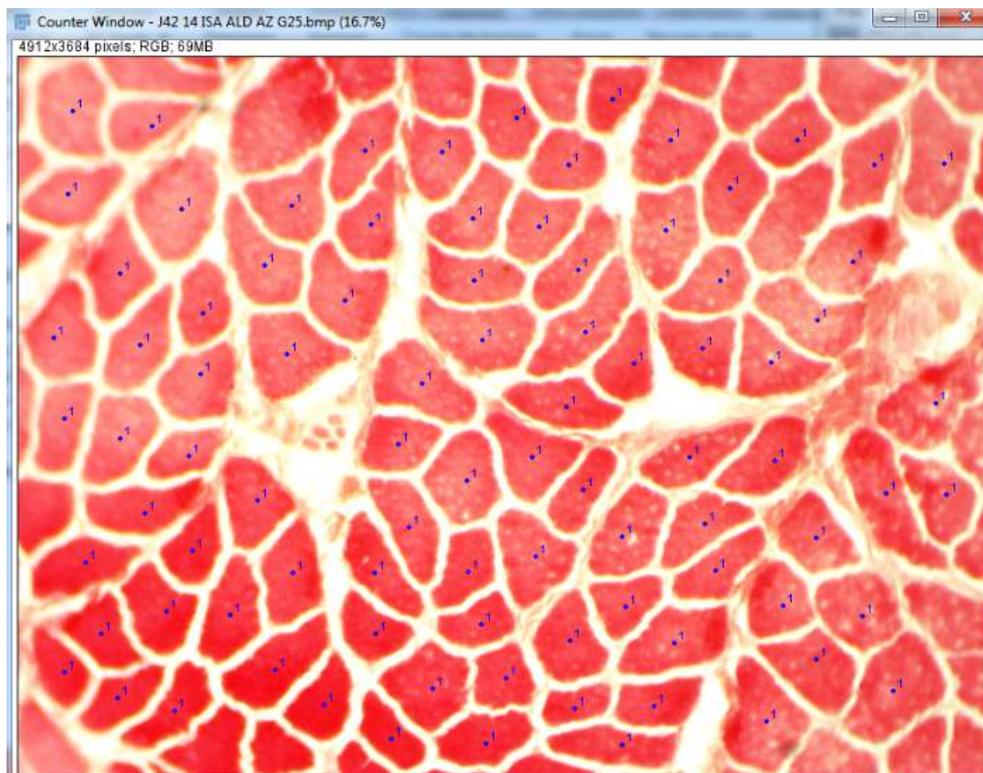


Figure 18: Calcul du nombre des fibres musculaires du muscle ALD d'un poulet âgé de 42 jours capturée par un grossissement x25 par l'application CellCounter du logiciel Fiji (photo personnelle).

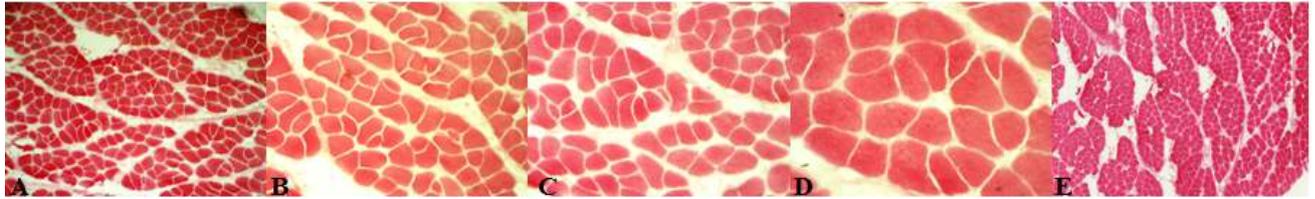


Figure 19: Images du muscle ALD d'un poulet âgé de 35 jours capturée par un microscope Optika grossissements x10 (A), x20(B), x25 (C), x40 et (D). E : Image scannée par Cytoinformatics LLC.

III.2 Segmentation

Une image d'Azorubine pour chaque âge étudié a été choisie au hasard parmi les 90 images du muscle ALD. Ces 9 images ont été segmentées par deux logiciels semi-automatiques universels qui sont Image Pro Plus 10 (IP) (une version récente qu'on a reçu gracieusement pour une période limitée par Media Cybernetics) et Fiji (disponible gratuitement). La segmentation avec Fiji a été réalisée par deux méthodes, l'une par un stylo numériseur interfacée avec ordinateur et l'autre par la souris d'un ordinateur, dans le but de les comparer avec les images correspondantes segmentées par Cytoinformatics LLC, de point de vue (Figure 20) :

- * Le temps requis pour la segmentation de chaque image par les trois logiciels.
- * Le calcul des paramètres morphométriques des cellules musculaires (Nombre, AST, DMF et Périmètre).

Notons que pour le calcul des nombres moyens des fibres par image, nous avons adopté les résultats de Cytoinformatics LLC comme références. Pour les autres paramètres nous avons pris comme référence les résultats de Fiji (stylo numériseur), le logiciel même par lequel les calculs de ces trois paramètres ont été effectués.

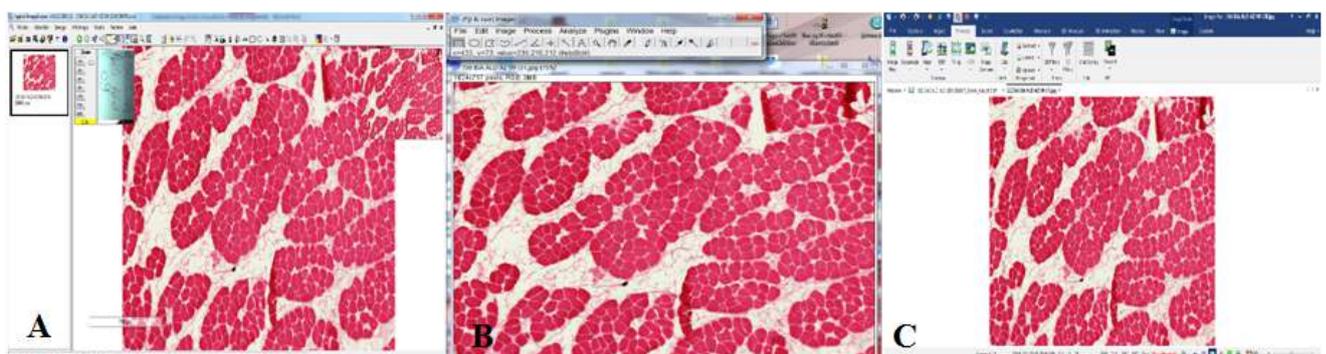


Figure 20: A- Image d'un muscle de poulet de chair âgé de 56 jours ouverte avec le logiciel de scanner des lames (fenêtre du logiciel Aperio ImageScope v12.3.2.8013 de Leica). B- Même image ouverte par le logiciel Fiji (fenêtre du logiciel Fiji). C- Même image ouverte par le logiciel Image Pro Plus 10 (fenêtre du logiciel Image Pro Plus 10).

III.2.1 Étapes de segmentation par Image Pro Plus 10 (IP)

Les images de la figure 21 montrent les étapes de la segmentation d'une image par Image Pro Plus 10.

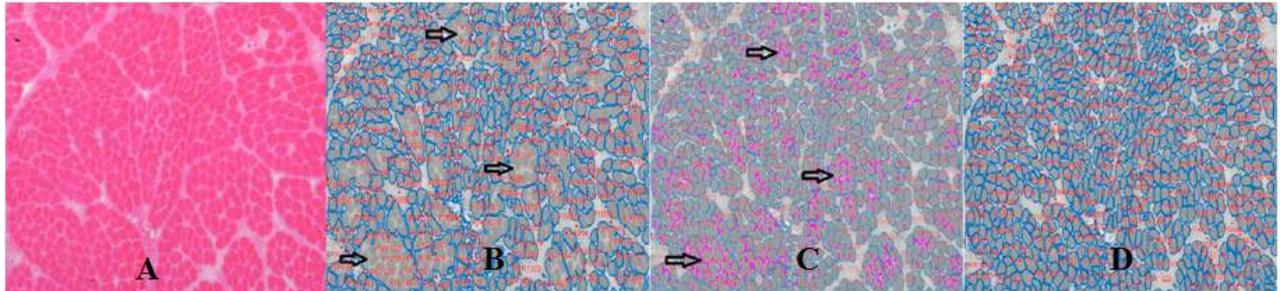


Figure 21: A- Image du muscle ALD d'un poulet âgé de 14 jours colorée par Azorubine. B- Segmentation automatique faite après l'utilisation d'un filtre de variance au canal vert afin d'améliorer les contours des fibres musculaires, les flèches noires indiquent des zones non segmentées. C- Segmentation manuelle faite par l'utilisation d'un stylo numériseur qui laisse des stries violettes. D- Une fois la segmentation manuelle terminée et afin d'exclure les objets extracellulaires ainsi que les artefacts du tissu conjonctif, une plage de taille spécifique a été appliquée. Une nouvelle segmentation a ensuite été réalisée pour obtenir une image correctement segmentée.

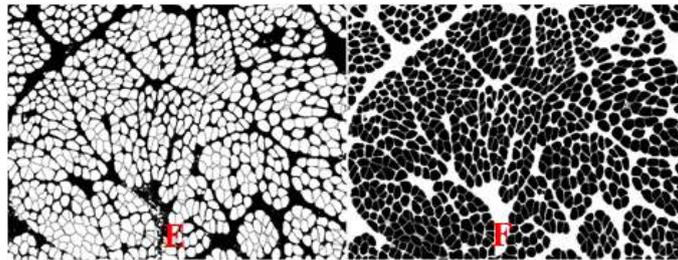


Figure 21 (suite): L'application de l'option « Mask all frames » du logiciel Image Pro Plus 10 a été appliquée sur l'image D pour obtenir la figure E qui sera traité par Fiji par suppression des artefacts et les tissus non pertinents.

III.2.2 Étapes de segmentation par le logiciel Fiji

La même image d'Azorubine segmentée dans la Figure 14 a été segmentée aussi par le logiciel Fiji comme illustré dans la Figure 22.

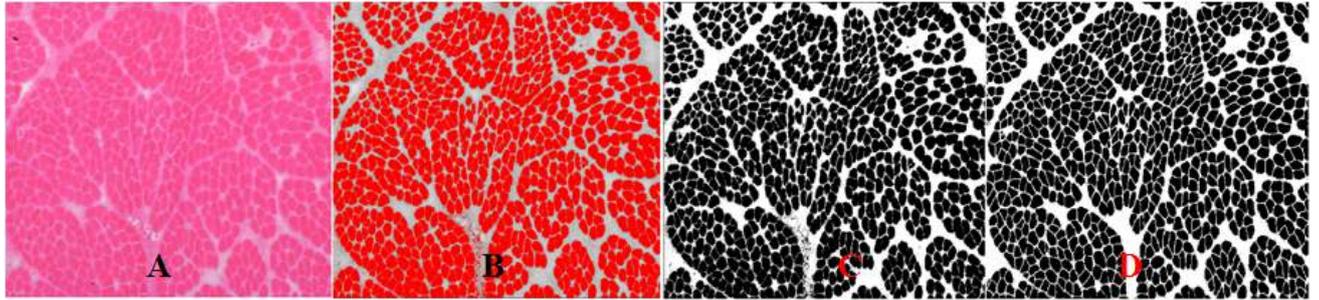


Figure 22: A- Image d'un muscle ALD d'un poulet âgé de 14 jours colorée par Azorubine, B- L'application d'un seuillage sur l'image de référence, C- Une image a été obtenue après l'étape de seuillage, montrant un grand nombre de fibres musculaires qui n'ont pas été segmentées. D- La segmentation a été réalisée manuellement en utilisant deux techniques : l'une avec un stylo numériseur connecté à un ordinateur et l'autre avec une souris d'ordinateur. L'élimination des artefacts et des tissus non pertinents a été effectuée à l'aide de l'outil Drawing Tools pour les deux techniques de segmentation.

III.3 Post traitement des images segmentées par Fiji

Après l'étape de la segmentation avec les trois logiciels, nous avons procédé à une étape de post-traitement par le logiciel Fiji qui consiste à supprimer les artefacts, les tissus non pertinents et de séparer les cellules musculaires juxtaposées, avec le calcul du temps requis. La figure 23 montre le post traitement par Fiji de l'image segmentée précédemment (Figure 21 et 22) par les trois logiciels (Fiji « FDP, FM », CytoF et IP).

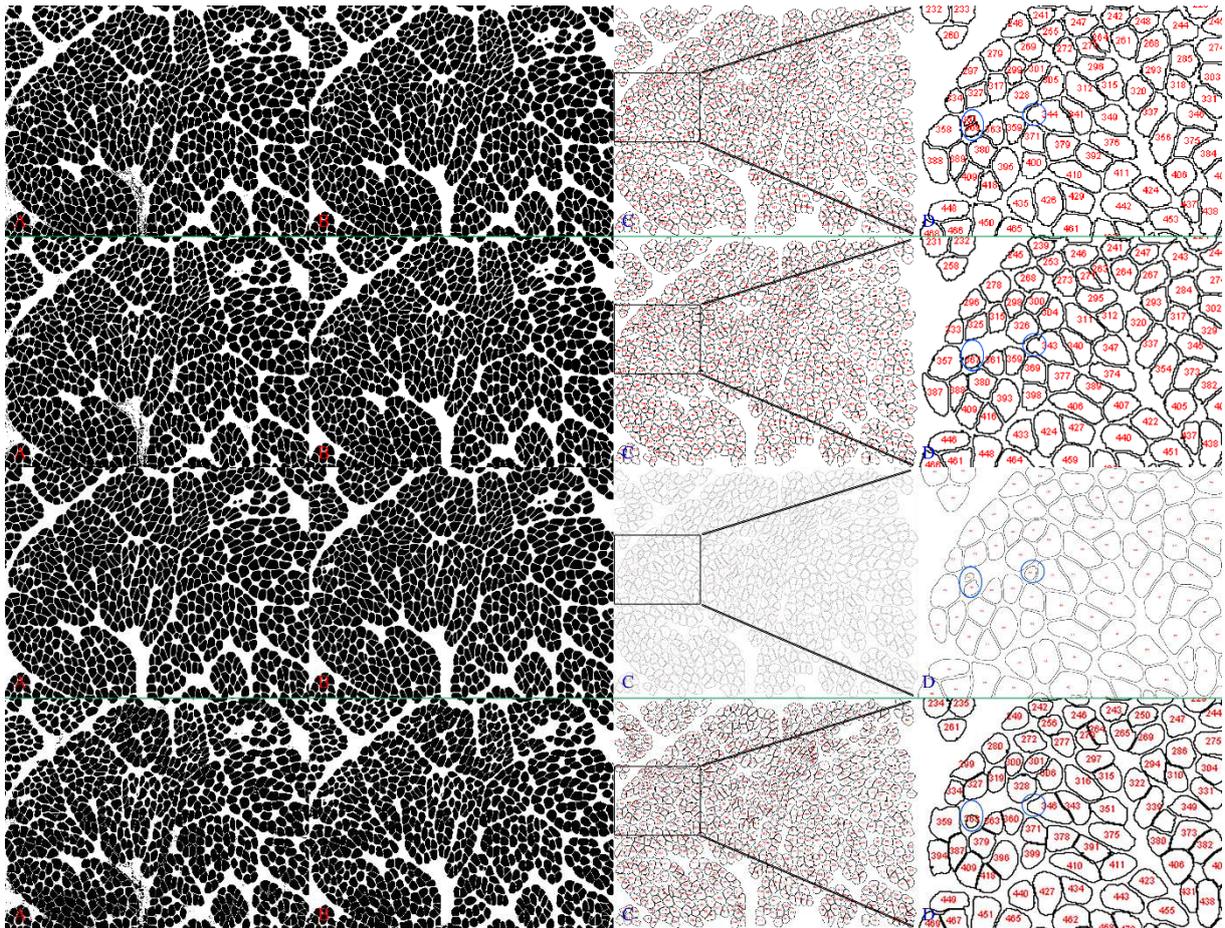


Figure 23: Post-traitement d'une image segmentée par les 3 logiciels (Fiji « FDP, FM », CytoF et IP) par Fiji. Les quatre images de la colonne (D) sont des agrandissements des lieux encadrés au hasard dans la colonne (C), le logiciel CytoF étant celui qui comptait le plus de fibres (cercles en bleu).

IV. ÉTUDE STATISTIQUE

Nous avons effectué plusieurs comparaisons entre les images acquises à partir des lames du scanner de diapositives et celles obtenues par microscopie optique à divers grossissements, en examinant le nombre de fibres musculaires à différents stades de développement. Pour ce faire, nous avons utilisé une analyse de variance (ANOVA) suivie d'une correction de Bonferroni pour les tests de comparaisons multiples.

De multiples comparaisons descriptives concernant les méthodes de segmentation ont été effectuées à l'aide d'Excel entre :

- Deux méthodes de segmentation différentes du logiciel Fiji « FDP, FM », et IP concernant le temps nécessaire à la segmentation des 9 images.
- Trois logiciels Fiji "FDP, FM", CytoF et IP concernant le temps nécessaire au post-traitement de l'image et le nombre de fibres dans la même image.

La comparaison entre les 3 logiciels concernant les paramètres morphométriques des fibres (AST, DMF et Périmètre) a été réalisée à l'aide d'une ANOVA suivie d'un Tukey's multiples comparaisons tests. Le temps requis pour la segmentation et le post-traitement a été converti en minutes pour effectuer une comparaison entre les logiciels concernant le temps estimé par ANOVA. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de SPSS 22 et les données ont été présentées sous forme de moyennes et écart-type (mean \pm SD) et les différences de moyennes ont été considérées comme statistiquement significatives à $P < 0,05$.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

La viande blanche telle que la viande de poulet est considérée comme supérieure sur le plan de la santé humaine à la viande rouge en raison de sa teneur relativement faible en graisses et en cholestérol. Les consommateurs reconnaissent également le prix relativement bas, les portions généralement pratiques et l'absence de restriction religieuse contre sa consommation (Jaturasitha, 2004).

I. ÉTUDE HISTOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE DES MUSCLES ETUDIÉS

I.1 Évolution du poids vif des poulets pour chaque âge d'étude

Les résultats relatifs à l'évolution du poids vif en fonction de l'âge ainsi que le taux de croissance sont rassemblés dans le Tableau 5.

Tableau 5: Évolution du poids vif moyen et le taux de croissance des poulets de l'étude en fonction de l'âge

	J0	J7	J14	J21	J28	J35	J42	J49	J56
Poids vif (g)	41,77 ± 2,53	109,68 ± 10,45	338,59 ± 14,37	694,20 ± 66,51	987,08 ± 73,10	1648,00 ± 124,21	2103,50 ± 268,96	2334,50 ± 347,02	2966,00 ± 259,53
Taux de croissance (%)		162,58	208,70	105,02	41,61	66,95	27,63	10,98	27,05

Les variations du poids vif moyen, résumées dans le Tableau 5, montre que ce poids prend des valeurs extrêmes qui varient de $41,77 \pm 2,53$ g au premier jour post éclosion à $2966,00 \pm 259,53$ g à l'âge d'abattage. Après avoir atteint les valeurs maximales 162,58% et 208,70% à la première et la deuxième semaine respectivement, le taux de croissance a connu une diminution progressive pour atteindre la valeur la plus basse (10,98%) entre la 6^{ème} et la 7^{ème} semaine pour remonter à nouveau et arriver à la valeur de 27,05% dans la dernière semaine d'âge.

I.2 Étude des paramètres morphométriques des fibres musculaires pour chaque muscle étudié

I.2.1 Calcul du nombre total des fibres dans le muscle antérieur latissimus dorsi (ALD)

Les résultats sont décrits dans le Tableau 6. Le muscle ALD contient plus de 4000 fibres en moyenne dans tous les âges étudiés avec un nombre qui dépasse les 5300 fibres aux âges J7, J14 et J21 pour diminuer progressivement jusqu'à la valeur la plus basse (4221) à l'âge d'abattage. À l'éclosion, le nombre moyen de fibres est de 4851.

Tableau 6: Évolution du nombre total des fibres musculaires du muscle ALD en fonction de l'âge.

Jour	J0	J7	J14	J21	J28	J35	J42	J49	J56
Nombre moyen	4851 _{a,b}	5467 _a	5309 _a	5449 _{a,b}	4950 _{a,b}	4669 _{a,b}	4722 _{a,b}	4743 _{a,b}	4211 _b
Erreur standard	379	154	181	288	323	296	221	368	187

I.2.2 Comptage de l'aire de section transversale (AST) des fibres musculaires des trois muscles

I.2.2.1 Pectoral Superficiel (Ps)

Le Tableau 7 montre que toutes les fibres du muscle Ps sont de types IIB. Ces fibres ont une évolution croissante de l'AST allant de $22,86 \pm 6,16 \mu\text{m}^2$ au premier jour post éclosion jusqu'au $1499,06 \pm 487,37 \mu\text{m}^2$ au 42^{ème} jour, avec une légère diminution au 49^{ème} $1394,94 \pm 341,00 \mu\text{m}^2$ jour pour remonter après à la fin de la période d'élevage à une valeur de $2227,25 \pm 511,66 \mu\text{m}^2$. Pas de différence significative dans l'AST des fibres IIB du muscle Ps et celles des fibres IIB du muscle Sart M et Sart R.

À J0, nous n'avons pas pu effectuer d'analyse statistique car la variable IIA+IIB n'est présente qu'à J0, mais La comparaison entre l'aire de section transversale (AST) du muscle PS et celle des deux parties du muscle Sart nous a indiqué que l'AST des fibres de type IIB du muscle PS ($22,86 \pm 6,16$) est significativement inférieure à celle des fibres de type IIA+IIB du Sart M ($67,68 \pm 10,07$). Cette dernière est également inférieure à celle des fibres de type IIA+IIB du Sart R ($76,58 \pm 24,34$).

I.2.2.2 Antérieur Latissimus Dorsi (ALD)

À l'éclosion, les techniques de typage basées sur la réactivité de l'ATPase de la myosine ne permettent pas de distinguer les sous-types des fibres lentes identifiées. Ainsi, nous obtenons un pourcentage de fibres lentes de type I à 100%, avec une surface de $143,88 \pm 35,16 \mu\text{m}^2$, comme indiqué dans le Tableau 10. À partir de J7, la taille des fibres toniques IIIA et IIIB du muscle ALD ne montre pas de différence significative concernant l'aire de section transversale (AST) durant tous les âges étudiés, avec une légère tendance pour les fibres IIIB à être plus grandes que les fibres IIIA au début de la période d'élevage, tandis qu'à la fin de cette période, les fibres IIIA tendent à être plus grandes que les fibres IIIB (Tableau 7).

I.2.2.3 Sartorius Mixte (Sart M) et Sartorius Rapide (Sart R)

La moyenne de l'AST des fibres lentes I pour SART M à J0 est $41,94 \pm 6,49 \mu\text{m}^2$, pour sauter après à une valeur de $153,15 \pm 52,21 \mu\text{m}^2$ à J7, cette surface a connu une croissance régulière pour atteindre la valeur de $1605,69 \pm 389,84 \mu\text{m}^2$ à la fin de la période de l'élevage. À tous les âges de l'étude, il existe une différence significative entre l'AST des fibres lentes de type I du muscle Sart M et celles du muscle Sart R, avec des valeurs presque deux fois plus élevées en faveur des fibres I du muscle Sart M (Tableau 7).

A l'éclosion, il n'est pas possible de distinguer les sous-types des fibres rapides (IIA et IIB), et le Sart M présente donc un profil identique de fibres toutes rapides (IIA+IIB) avec un pourcentage de $67,67 \pm 10,06 \mu\text{m}^2$. À J7, les fibres IIA du muscle Sart M ont marqué une valeur de $287,36 \pm 65,13 \mu\text{m}^2$ pour atteindre la valeur de $1853,15 \pm 355,57 \mu\text{m}^2$ à l'âge d'abattage. Constatons qu'il n'y a pas de différence significative entre l'AST des fibres IIA des deux parties du muscle Sart. Les résultats des fibres IIB des deux parties du muscle Sart sont présentés avec ceux du muscle Ps (voir « I.2.2.1 Pectoral Superficiel (Ps)»). En revanche, les fibres de type IIA du muscle ALD, qui sont apparues dans les derniers âges de l'étude, présentent une AST très grande par rapport aux fibres IIA du muscle Ps et les deux parties du muscle Sart.

Tableau 7 : Aire de section transversale (AST) des différents types de fibres des trois muscles étudiés

Day	Fibre type	Mean of CSA and standard deviation (μm^2) PS	Mean of CSA and standard deviation (μm^2) SART M	Mean of CSA and standard deviation (μm^2) SART R	Mean of CSA and standard deviation (μm^2) ALD
0	I	/	41,94 \pm 6,50a	0	143,88 \pm 35,17c (100%)
07	I	/	153,15 \pm 52,21a	102,96 \pm 0b	/
14	I	/	167,42 \pm 52,54a	78,84 \pm 19,23b	/
21	I	/	214,94 \pm 44,66a	56,13 \pm 15,23b	/
28	I	/	323,70 \pm 67,28a	144,57 \pm 69,90b	/
35	I	/	864,37 \pm 345,69a	428,32 \pm 112,55b	/
42	I	/	1195,60 \pm 464,95a	539,26 \pm 466,46b	/
49	I	/	1273,96 \pm 380,12a	681,87 \pm 371,32b	/
56	I	/	1605,69 \pm 389,84a	857,43 \pm 230,29b	/
0	IIA + IIB	/	67,68 \pm 10,07	76,58 \pm 24,34(100%)	0
07	IIA	/	287,36 \pm 65,13a	266,46 \pm 43,13a	0
14	IIA	/	255,07 \pm 60,13a	265,78 \pm 66,10a	0
21	IIA	/	380,39 \pm 87,58a	448,96 \pm 91,16a	0
28	IIA	/	599,30 \pm 108,02a	505,40 \pm 74,68b	0
35	IIA	/	1005,40 \pm 358,53a	1123,50 \pm 368,54a	2554,85 \pm 0,00b
42	IIA	/	1439,57 \pm 411,51a	1459,68 \pm 513,70a	1988,24 \pm 476,02b
49	IIA	/	1450,66 \pm 419,73a	1461,38 \pm 520,95a	3503,64 \pm 939,44b
56	IIA	/	1853,15 \pm 355,57a	2079,30 \pm 253,15a	2459,31 \pm 0,00b
0	IIA + IIB	22,86 \pm 6,16	67,68 \pm 10,07	76,58 \pm 24,34(100%)	/
07	IIB	389,10 \pm 78,86a	390,73 \pm 57,97a	317,74 \pm 81,66a	/
14	IIB	446,23 \pm 116,23a	415,90 \pm 72,60a	360,55 \pm 100,50a	/
21	IIB	874,97 \pm 277,53a	577,26 \pm 151,25a	580,44 \pm 91,88a	/
28	IIB	891,48 \pm 225,32a,b	856,32 \pm 94,49a	688,68 \pm 135,02b	/

35	II B	1134,83 ± 167,63a	1240,56±373,35a	1495,44±334,30a	/
42	II B	1499,06 ± 487,37a	1696,84±444,80a	1848,01±412,63a	/
49	II B	1394,94 ± 341,00a	1781,12±447,64a	1588,55±250,00a	/
56	II B	2227,25 ± 511,66a	2094,41±385,85a	2366,85±273,16a	/
0	III A	/	/	/	0
07	III A	/	/	/	817,76±152,22
14	III A	/	/	/	738,11±162,98
21	III A	/	/	/	1239,72±309,33
28	III A	/	/	/	1434,70±384,92
35	III A	/	/	/	2500,39±836,58
42	III A	/	/	/	2196,86±536,02
49	III A	/	/	/	2242,76±304,45
56	III A	/	/	/	2982,75±1236,44
0	III B	/	/	/	0
07	III B	/	/	/	842,95±200,13
14	III B	/	/	/	749,63±152,56
21	III B	/	/	/	1234,63±313,20
28	III B	/	/	/	1507,12±450,19
35	III B	/	/	/	2725,06±1182,09
42	III B	/	/	/	2403,56±476,23
49	III B	/	/	/	1892,12±765,11
56	III B	/	/	/	2669,39±953,56

Le classement de l'AST moyenne des différents types de fibres des différents stages de l'étude pour les trois muscles de façon croissante a été trouvé dans notre travail selon le **Tableau 8** comme suit : I (Sart R) $323,77 \mu\text{m}^2 \rightarrow$ I (Sart M) $648,97 \mu\text{m}^2 \rightarrow$ IIA (Sart M) $908,85 \mu\text{m}^2 \rightarrow$ IIA (Sart R) $951,30 \mu\text{m}^2 \rightarrow$ IIB (PS) $986,74 \mu\text{m}^2 \rightarrow$ IIB (Sart M) $1131,63 \mu\text{m}^2 \rightarrow$ IIA ALD $1138,74 \mu\text{m}^2 \rightarrow$ IIB (Sart R) $1155,78 \mu\text{m}^2 \rightarrow$ IIB ALD $1723,48 \mu\text{m}^2 \rightarrow$ IIIA ALD $1769,12 \mu\text{m}^2$. Tandis que la moyenne de l'ensemble des fibres de chaque muscle a donné le classement suivant : Sart $658,06 \mu\text{m}^2 \rightarrow$ PS $986,74 \mu\text{m}^2 \rightarrow$ ALD $1193,80 \mu\text{m}^2$.

Tableau 8: Moyennes des aires de section transversale (AST) des fibres dans différentes classes d'âge pour chaque type de fibre étudié.

Muscle	Type de fibre	J0	J7	J14	J21	J28	J35	J42	J49	J56	Moyenne
PS	IIB	22,85	389,10	446,22	874,96	891,48	1134,82	1499,06	1394,93	2227,24	986,74
ALD	IIA			219,96	2074,03	2062,28	1143,28	1185,85	875,90	409,88	1138,74
	IIIA		817,76	738,11	1239,71	1434,69	2500,38	2196,86	2242,75	2982,75	1769,12
	IIIB		842,95	749,63	1234,63	1507,12	2725,05	2403,55	1655,60	2669,38	1723,48
	IIIA+IIIB	143,88									143,88
Sart M	I	41,94	153,15	167,42	214,93	323,70	864,36	1195,59	1273,95	1605,69	648,97
	IIA		287,36	255,06	380,38	599,29	1005,39	1439,57	1450,66	1853,15	908,85
	IIB		390,73	415,90	577,26	856,32	1240,55	1696,83	1781,11	2094,40	1131,63
	IIA+IIB	67,67									67,67
Sart R	I		17,16	52,55	28,06	80,31	367,13	539,25	1015,76	489,95	323,77
	IIA		266,46	265,78	448,95	505,39	1123,50	1459,68	1461,37	2079,30	951,30
	IIB		317,73	360,55	580,44	688,68	1495,44	1848,01	1588,55	2366,85	1155,78
	IIA+IIB	76,58									76,58

I.2.3 Calcul du diamètre moyen de Feret (DMF) des fibres musculaires des trois muscles de l'étude

I.2.3.1 Pectoral Superficiel (Ps)

Le DMF des fibres IIB a une cinétique de croissance semblable à celle de la AST des mêmes fibres avec des valeurs allant de $4,66 \pm 0,61 \mu\text{m}$ au premier jour d'élevage à la valeur de $45,48 \pm 5,47 \mu\text{m}$ à la fin de la période d'élevage. Ce paramètre ne montre pas une différence significative entre les fibres IIB du muscle Ps et les valeurs du même type de fibres des deux muscles Sart M et Sart R dans tous les âges étudiés. Le coefficient de variabilité a montré des chiffres toujours inférieurs à 250 dans tous les âges étudiés pour les fibres IIB des trois muscles Ps, Sart M et Sart R (Tableau 9).

I.2.3.2 Antérieur Latissimus Dorsi (ALD)

A J0 on a un pourcentage de fibres 100% lentes I qui ont un DMF de $11,58 \pm 1,50 \mu\text{m}$ comme indiqué dans le tableau 12 avec un coefficient de variabilité de 129,53. De J7, le DMF des fibres IIIA a une valeur de $27,96 \pm 3,04 \mu\text{m}$ pour atteindre en fin de période d'élevage la moyenne de $51,23 \pm 9,83 \mu\text{m}$; les fibres IIIB ont montré presque des valeurs similaires à celles des fibres IIIA et donc pas de différence significative concernant le DMF entre les deux types de fibres IIIA et IIIB du muscle ALD à travers tous les âges étudiés. Les coefficients de variabilité des deux types de fibres toniques (IIIA et IIIB) du muscle ALD n'ont pas montré de valeurs extrêmes dépassant 250, à l'exception des fibres IIIB à l'âge de J49 avec une valeur de 445,72 (Tableau 9).

I.2.3.3 Sartorius Mixte (Sart M) et Sartorius Rapide (Sart R)

Le DMF des fibres lentes I pour Sart M à J0 est $6,11 \pm 0,55 \mu\text{m}$, pour sauter après à une valeur de $11,66 \pm 1,99 \mu\text{m}$ à J7, ce paramètre a connu une croissance régulière pour atteindre la valeur de $36,04 \pm 5,38 \mu\text{m}$ à la fin de la période de l'élevage. Durant tous les âges de l'étude, il y a une différence significative entre le DMF des fibres lentes I du muscle Sart M et celles du muscle Sart R (Tableau 9).

Le Sart M présente à l'éclosion un profil identique de fibres toutes rapides (IIA+IIIB) avec une moyenne de DMF de $7,67 \pm 0,62 \mu\text{m}$. À J7, les fibres IIA du muscle Sart M ont marqué une valeur de $15,76 \pm 1,92 \mu\text{m}$ pour arriver à la valeur de $38,05 \pm 4,34 \mu\text{m}$ à l'âge d'abattage. Il n'y a pas de différence significative entre le DMF des fibres IIA et IIB des deux parties du muscle Sart dans presque la plupart des tranches d'âges étudiées mais il y a nette différence significative avec les fibres IIA du muscle ALD qui ont un DMF nettement plus petit par rapport aux fibres de Sart M et Sart R (Tableau 9).

Les coefficients de variabilité pour les fibres IIA et IIB des deux parties du muscle Sart ont montré des chiffres toujours inférieurs à 250 dans tous les âges étudiés et même cas pour les fibres lentes I de la partie mixte du muscle Sart, par contre le Sart R a une coefficient de variabilité toujours supérieur à 250 dans tous les âges de l'étude sauf à l'âge de J56 où il a marqué une valeur de 123,11 (Tableau 9). Les fibres IIA constatées dans le muscle ALD aux derniers âges d'élevage ont un coefficient de variabilité très élevé.

Tableau 9: Diamètre moyen de Feret (DMF) des différents types de fibres des trois muscles étudiés.

Day	Fibre type	Mean of DMF ± Standard Deviation (µm) Ps	Variability coefficient Ps	Mean of DMF ± Standard Deviation (µm) Sart M	Variability coefficient Sart M	Mean of DMF ± Standard Deviation (µm) Sart R	Variability coefficient Sart R	Mean of DMF ± Standard Deviation (µm) ALD	Variability coefficient ALD
0	I	/	/	6,11 ± 0,55	90,39	0	0	11,58 ± 1,50	129,53
07	I	/	/	11,66 ± 1,99a	171,00	1,78 ± 4,37b	2449,48	/	/
14	I	/	/	12,18 ± 2,14a	175,67	5,40 ± 4,34b	804,01	/	/
21	I	/	/	13,49 ± 1,70a	126,29	3,25 ± 3,59b	1103,44	/	/
28	I	/	/	16,60 ± 1,71a	102,95	6,17 ± 6,11b	991,73	/	/
35	I	/	/	27,11 ± 5,68a	209,46	16,15 ± 7,46b	461,71	/	/
42	I	/	/	31,90 ± 6,11a	191,50	19,96 ± 7,90b	396,09	/	/
49	I	/	/	33,23 ± 4,92a	148,18	23,41 ± 6,10b	260,56	/	/
56	I	/	/	36,04 ± 5,38a	149,20	25,53 ± 3,14b	123,11	/	/
0	IIA + IIB	/	/	7,67 ± 0,62	80,83	8,14 ± 1,27	156,02	0	0
07	IIA	/	/	15,76 ± 1,92a	121,63	15,33 ± 1,31a	85,15	0	0
14	IIA	/	/	14,89 ± 2,00a	134,56	14,83 ± 2,14a	144,07	0	0
21	IIA	/	/	17,28 ± 2,36a	136,75	18,99 ± 1,89a	99,70	0	0
28	IIA	/	/	21,86 ± 2,09a	95,38	20,42 ± 1,39a	68,30	0	0
35	IIA	/	/	28,32 ± 5,20b	183,53	31,18 ± 5,09b	163,16	6,67 ± 17,65a	2645,75
42	IIA	/	/	33,96 ± 4,74a	139,59	34,46 ± 6,17a	179,02	15,55 ± 21,61a	1389,43
49	IIA	/	/	35,01 ± 5,62a	160,59	35,41 ± 6,35a	179,34	13,44 ± 24,92a	1853,40
56	IIA	/	/	38,05 ± 4,34b	114,08	43,05 ± 2,47b	57,39	7,61 ± 18,64a	2449,48
0	IIA + IIB	4,66 ± 0,61	131,32	7,67 ± 0,62	80,83	8,14 ± 1,27	156,02	/	/
07	IIB	18,31 ± 2,00a	109,39	19,01 ± 1,60a	83,95	16,67 ± 2,25a	134,97	/	/
14	IIB	19,40 ± 3,11a	160,13	19,32 ± 1,77a	91,70	17,35 ± 2,65a	152,70	/	/
21	IIB	29,05 ± 7,05a	242,60	22,04 ± 3,27a	148,29	21,70 ± 1,85a	85,45	/	/
28	IIB	27,51 ± 3,82a	138,79	26,82 ± 1,60a	59,68	24,03 ± 2,47a	102,88	/	/

35	IIБ	33,04 ± 2,71a	82,00	32,29 ± 4,93a	152,74	35,66 ± 4,17a	116,90	/	/
42	IIБ	36,99 ± 5,84a	157,74	37,31 ± 4,83a	129,59	39,21 ± 4,27a	108,84	/	/
49	IIБ	36,24 ± 3,83a	105,58	39,50 ± 6,04a	152,87	36,92 ± 4,06a	110,07	/	/
56	IIБ	45,48 ± 5,47a,b	120,17	41,49 ± 4,47a	107,62	47,17 ± 2,39b	50,73	/	/
0	IIIА	/	/	/	/	/	/	0	0
07	IIIА	/	/	/	/	/	/	27,96 ± 3,04	108,59
14	IIIА	/	/	/	/	/	/	25,24 ± 2,64	104,44
21	IIIА	/	/	/	/	/	/	32,49 ± 4,10	126,25
28	IIIА	/	/	/	/	/	/	34,99 ± 4,38	125,04
35	IIIА	/	/	/	/	/	/	45,00 ± 6,53	145,15
42	IIIА	/	/	/	/	/	/	43,39 ± 5,30	122,04
49	IIIА	/	/	/	/	/	/	45,15 ± 3,36	74,52
56	IIIА	/	/	/	/	/	/	51,23 ± 9,83	191,96
0	IIIБ	/	/	/	/	/	/	0	0
07	IIIБ	/	/	/	/	/	/	28,25 ± 3,69	130,75
14	IIIБ	/	/	/	/	/	/	25,47 ± 2,20	86,43
21	IIIБ	/	/	/	/	/	/	32,28 ± 3,90	120,71
28	IIIБ	/	/	/	/	/	/	35,89 ± 4,98	138,81
35	IIIБ	/	/	/	/	/	/	46,52 ± 8,37	180,03
42	IIIБ	/	/	/	/	/	/	45,50 ± 3,98	87,51
49	IIIБ	/	/	/	/	/	/	36,32 ± 16,19	445,72
56	IIIБ	/	/	/	/	/	/	49,99 ± 10,23	204,67

Dans la présente étude, le classement croissant des diamètres moyens des fibres (DMF) pour tous les âges étudiés et pour les différents types de fibres est le suivant : IIA (ALD) 10,81 μm \rightarrow I (Sart R) 12,70 μm \rightarrow I (Sart M) 20,92 μm \rightarrow IIA (Sart M) 25,64 μm \rightarrow IIA (Sart R) 26,70 μm \rightarrow IIB (Ps) 27,85 μm \rightarrow IIB (Sart M) 29,72 μm \rightarrow IIB (Sart R) 29,83 μm \rightarrow IIIA (ALD) 37,52 μm \rightarrow IIB (ALD) 38,18 μm (Tableau 10). Alors que la moyenne de la totalité des fibres de chacun des muscles étudiés a révélé le classement suivant : Sart 24,24 μm \rightarrow Ps 27,85 μm \rightarrow ALD 28,83 μm .

Tableau 10: Moyennes des diamètres moyens de Feret (DMF) dans différents âges étudiés pour chaque type de fibre étudié.

Muscle	Type de fibre	J0	J7	J14	J21	J28	J35	J42	J49	J56	Moyenne
PS	IIB	4,66	18,31	19,40	29,05	27,51	33,04	36,99	36,24	45,48	27,85
ALD	IIA	/	/	/	/	/	6,67	15,55	13,44	7,61	10,81
	IIIA	/	27,96	25,24	32,49	34,99	45,00	43,39	45,15	51,23	38,18
	IIIB	/	28,25	25,47	32,28	35,89	46,52	45,50	36,32	49,99	37,52
	IIIA+IIIB	11,58	/	/	/	/	/	/	/	/	11,58
Sart M	I	6,11	11,66	12,18	13,49	16,60	27,11	31,90	33,23	36,04	20,92
	IIA	/	15,76	14,89	17,28	21,86	28,32	33,96	35,01	38,05	25,64
	IIB	/	19,01	19,32	22,04	26,82	32,29	37,31	39,50	41,49	29,72
	IIA+IIB	7,67	/	/	/	/	/	/	/	/	7,67
Sart R	I		1,78	5,40	3,25	6,17	16,15	19,96	23,41	25,53	12,70
	IIA		15,33	14,83	18,99	20,42	31,18	34,46	35,41	43,05	26,70
	IIB		16,67	17,35	21,70	24,03	35,66	39,21	36,92	47,17	29,83
	IIA+IIB	8,14	/	/	/	/	/	/	/	/	8,14

I.3 Pourcentage de différents types de fibres dans les trois muscles

I.3.1 Pectoral Superficiel (Ps)

Pour ce muscle, les fibres de type IIB représentent plus de 99 %, avec seulement quelques rares cas de fibres de type IIA.

I.3.2 Antérieur Latissimus Dorsi (ALD)

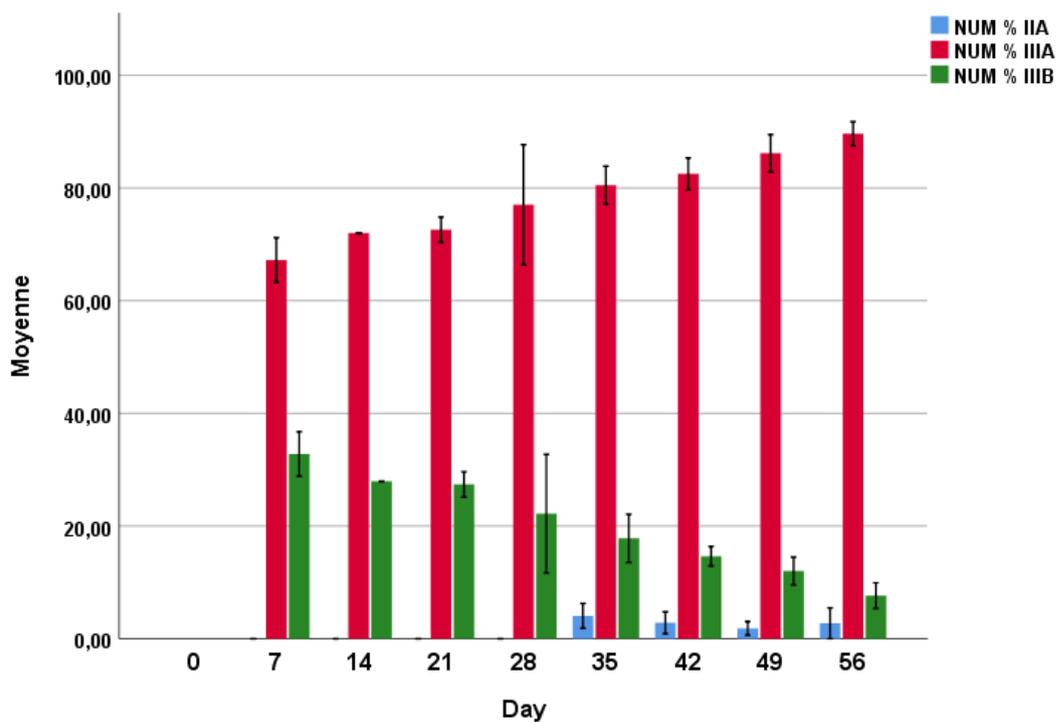


Figure 24: Évolution de la typologie du muscle ALD avec l'âge.

À J0, les fibres du muscle ALD ont un pourcentage de 100% types lentes I (voir la cause dans l'AST du muscle ALD). Ensuite, il y a une augmentation progressive du pourcentage des fibres IIIA, qui est toujours au-delà de 60 % et atteint 85 % vers la fin de la période d'élevage. Cette augmentation s'accompagne d'une diminution concomitante du pourcentage des fibres IIIB, passant de 25 % à environ 5 %. Contrairement à la répartition uniforme des fibres IIIA sur toute la surface du muscle ALD, la diminution des fibres IIIB avec l'âge est plus prononcée dans la moitié caudale de ce muscle. Les fibres de type IIA sont absentes au début de l'étude, mais elles apparaissent dans les dernières semaines d'élevage, représentant un pourcentage qui ne dépasse pas 5 % dans les parties crâniale et médio-crâniale, et dans de rares cas dans la partie caudale. Chez certains sujets, des fibres de type II sont dispersées sur toute la surface du muscle (Figure 24).

I.3.3 Sartorius M (Sart M)

Le pourcentage des fibres lentes de type I à J0 était de 20,94%, tandis que les fibres de type IIA + IIB représentaient 79,05%. Pour la partie mixte du muscle sartorius, il y a une diminution du pourcentage des fibres IIA de 65% à 40% et une augmentation de celles de type IIB de 18%, de sorte qu'elles deviennent presque identiques aux fibres IIA à l'âge d'abattage. Les fibres de type I ont un pourcentage presque stable à tous les âges étudiés, ne dépassant pas les 20% (Figure 25).

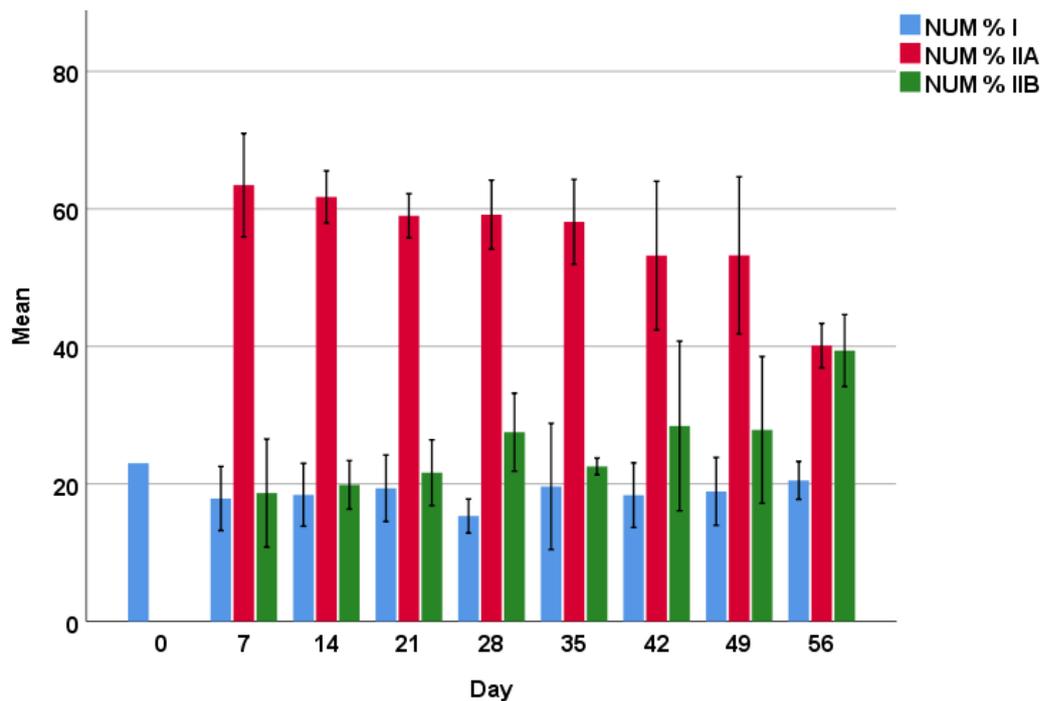


Figure 25: Évolution de la typologie du muscle Sart M avec l'âge.

I.3.4 Sartorius Rapide (Sart R)

Dans la partie rapide du muscle sartorius, on a enregistré 100% de fibres de type IIA+IIB à J0. À partir de J7, il y a une légère augmentation des fibres de type IIB de 75% à 85% jusqu'à l'âge d'abattage, accompagnée d'une diminution progressive des fibres de type IIA de 25% à 15%. Les fibres lentes ont une représentation presque négligeable aux premiers âges et un pourcentage inférieur à 5% aux âges suivants (Figure 26).

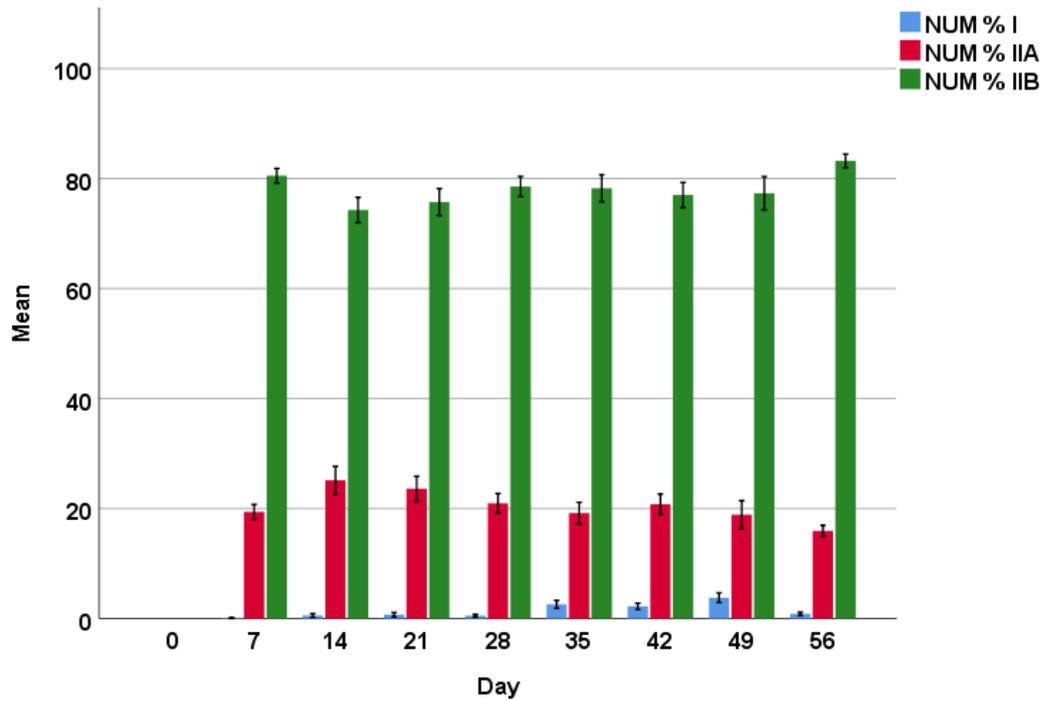


Figure 26: Évolution de la typologie du muscle Sart R avec l'âge.

I.4 Répartition et distribution des différents types de fibres au sein des faisceaux musculaires

D'après l'analyse de toutes les images traitées pour établir la typologie des muscles, la répartition et la distribution régionale des fibres au sein des faisceaux musculaires se font comme suit :

I.4.1 Pectoral Superficiel (Ps)

99% des fibres musculaires du muscle Ps sont des fibres rapides de type IIB, qui se trouve au sein des faisceaux musculaires très serrés (Figure 27).

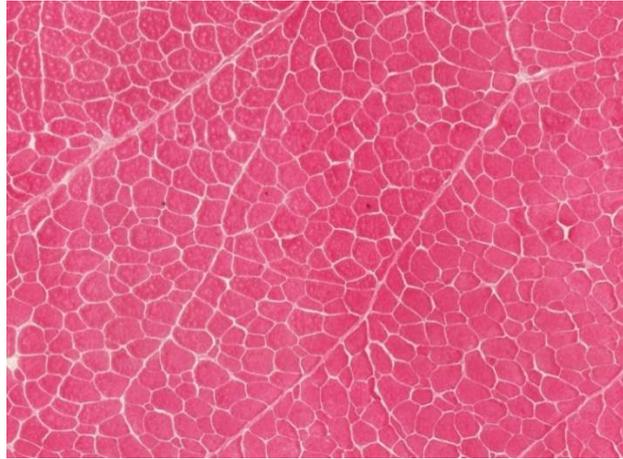


Figure 27: Coupe transversale du muscle Ps d'un poulet de 42 jours.

I.4.2 Antérieur Latissimus Dorsi (ALD)

Les techniques de réactivité ATPasique ne nous ont permis d'identifier les différents types de fibres qui composent le muscle ALD qu'à partir du septième jour. La répartition des fibres de type IIIB au sein du muscle ALD s'est concentrée davantage au centre des faisceaux par rapport à la périphérie que les fibres de type IIIA (Figure 28).

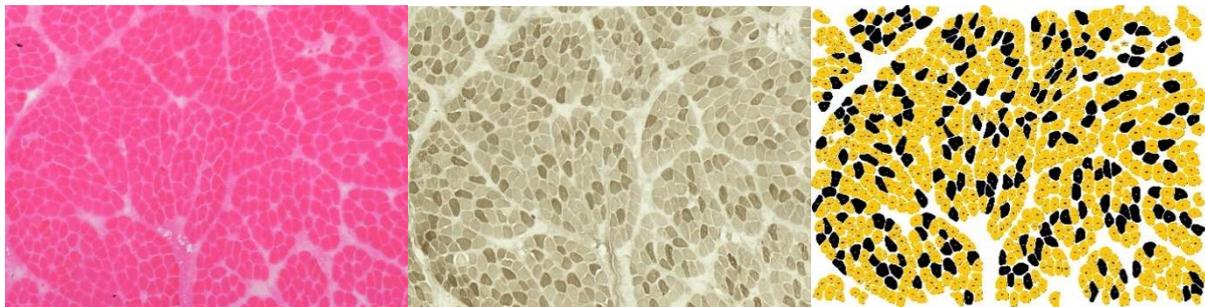


Figure 28: Typologie du muscle ALD d'un poulet âgé de 14 jours. Les fibres de type IIIB sont en noir et les fibres de type IIIA en orange.

Sachant que les faisceaux de ce muscle ont une architecture et une taille différentes de celles du muscle Ps et du sartorius (cette partie sera traitée dans un autre travail), les fibres de type IIA sont rares, surtout aux premiers âges de croissance. Elles apparaissent aux derniers âges chez quelques sujets à la périphérie de ce muscle, à proximité de l'épimysium, notamment dans les parties crâniale et médio-crâniale (Figure 29, images i, j) et caudale (Figure 30). Chez d'autres sujets, une partie de ces fibres est dispersée au centre du muscle ALD.

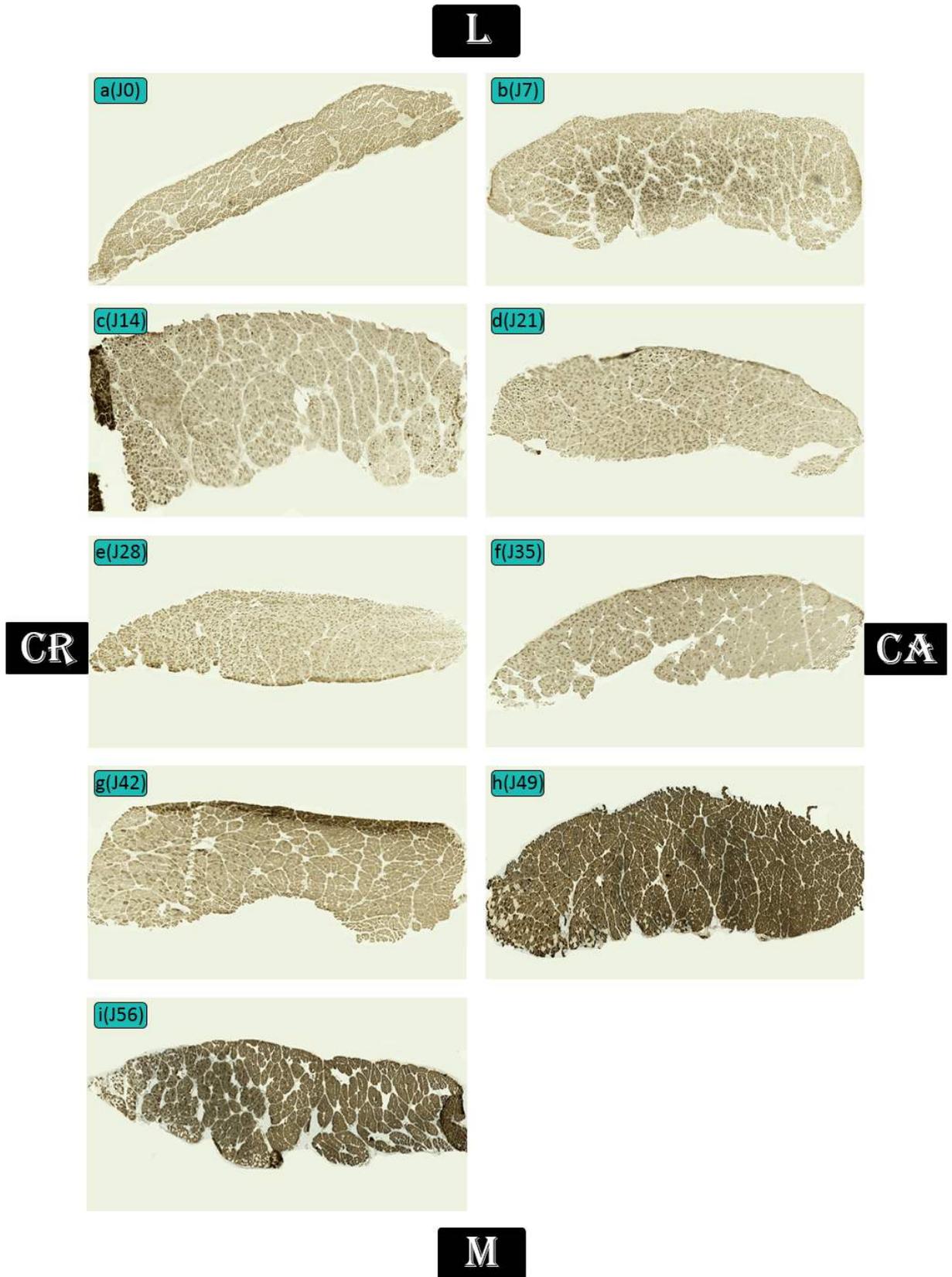


Figure 29: Images complètes du muscle ALD révélant l'activité ATPasique à différents âges (J0, J7, J14, J21, J28, J35, J42, J49 et J56). L : latéral, M : médial, cr : crânial, ca : caudal.

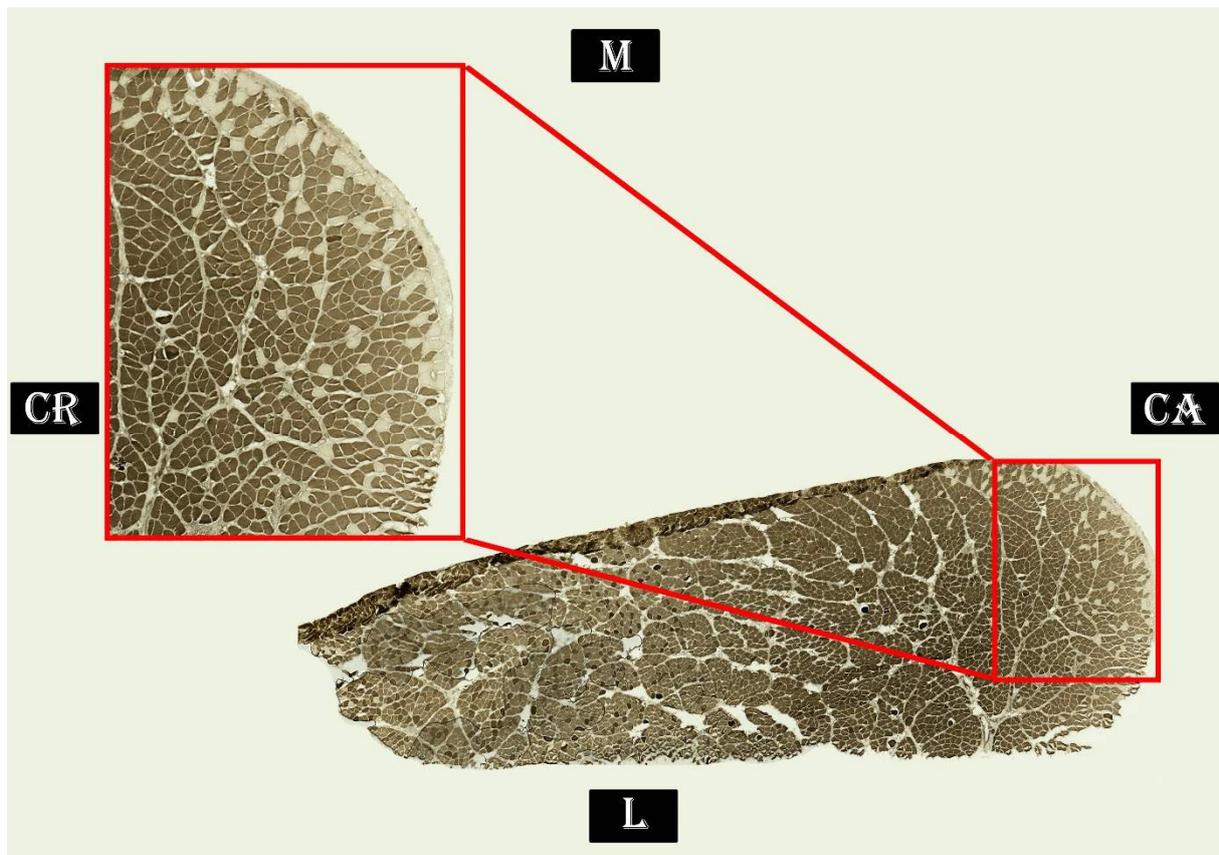


Figure 30: Typologie du muscle ALD d'un poulet âgé de 35 jours. Les fibres de type IIIB sont en noir, celles de type IIIA en gris et les fibres de type IIA en blanc, concentrées dans la partie médio-caudale du muscle. L : latéral, M : médial, cr : crânial, ca : caudal.

I.4.3 Sartorius (Sart)

L'inspection minutieuse des différentes coupes sériées des muscles sartorius nous a révélé qu'il n'est pas composé de deux parties, mixte et rapide, comme le suggéraient des recherches précédentes (Remignon, 1993 ; Remignon et al., 1996). En réalité, il existe une zone intermédiaire entre ces deux parties. Cette zone contient moins de fibres lentes (type I) et des fibres rapides de type IIA par rapport à la partie mixte, et contrairement à la partie rapide, elle ne contient pas de fibres lentes (Figure 31).

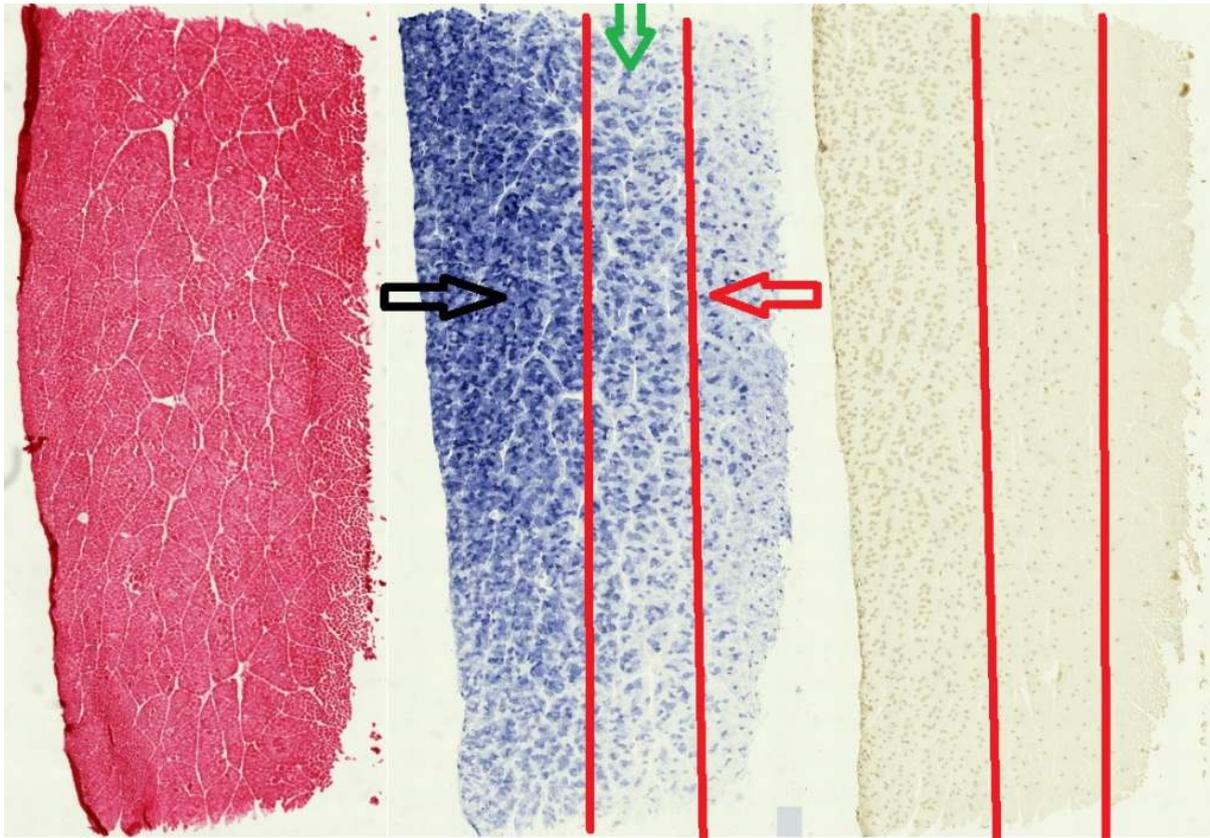


Figure 31: Images s eries d'une coupe transversale partielle du muscle Sart d'un poulet âgé de 42 jours, la flèche noire indique la partie médiale du muscle qui est mixte, la flèche rouge indique la partie latérale qui est rapide, et la flèche verte indique la partie intermédiaire du muscle Sart.

D'après ces images, on peut conclure que le muscle sartorius n'est pas réellement composé de deux parties distinctes, mixte (face médiale du muscle) et rapide (face latérale du muscle). En fait, il existe un gradient de distribution des fibres de type I et IIA qui diminuent progressivement de la partie médiale (profonde) vers la partie latérale (superficielle) du muscle. En revanche, les fibres de type IIB augmentent progressivement de la partie médiale vers la partie latérale (Figure 31).

De plus, la distribution des cellules musculaires au sein des faisceaux musculaires suit le même schéma que la répartition générale précédemment décrite : les fibres lentes de type I (SO) se trouvent en profondeur des faisceaux, les fibres de type IIA (FOG) dans les zones intermédiaires, tandis que les fibres de type IIB (FG) se situent à la périphérie des faisceaux (Figure 32).

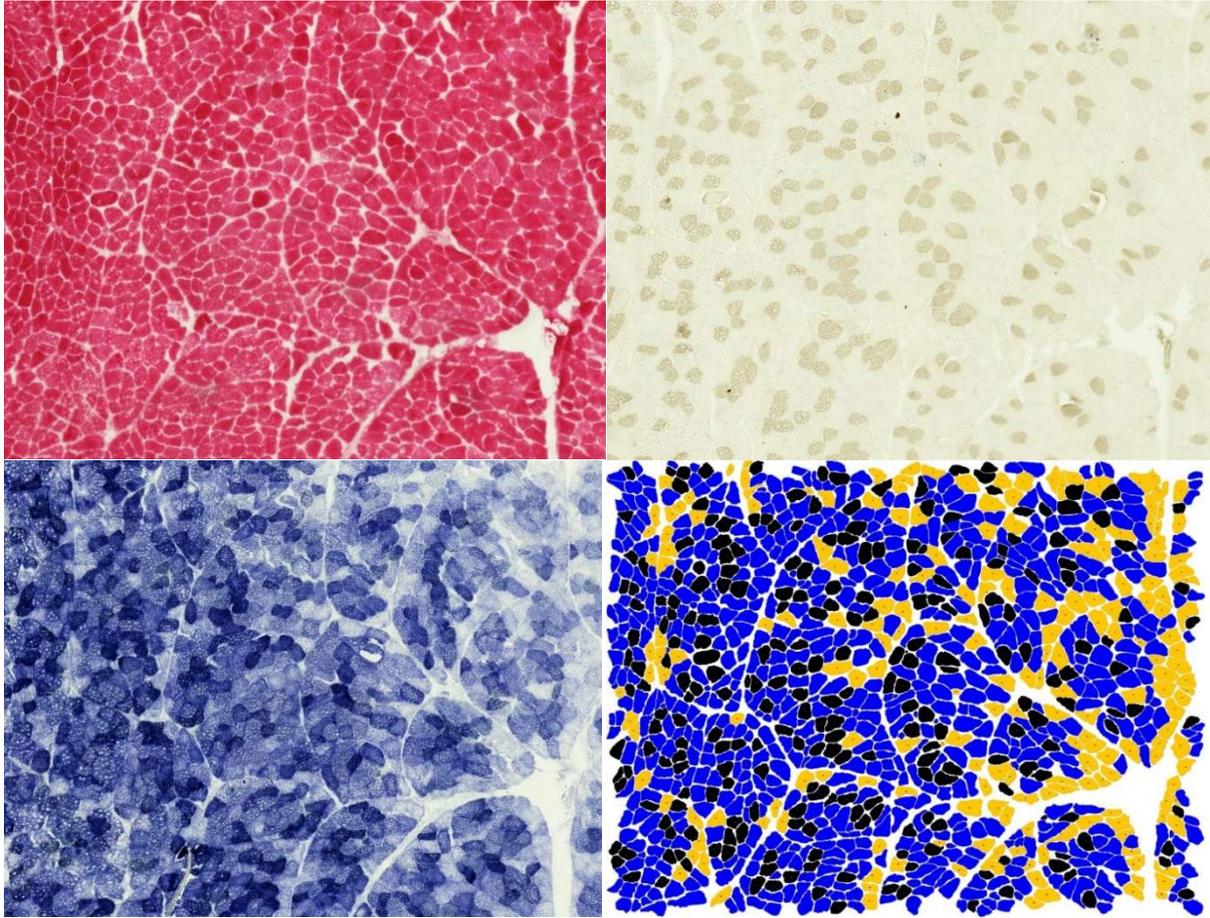


Figure 32: Sélection des différents types de fibres sur une image du muscle sartorius (partie mixte) d'un poulet âgé de 42 jours : les fibres de type I (SO) sont représentées en noir, les fibres de type IIA (FOG) en bleu, et les fibres de type IIB (FG) en orange.

II. ÉTUDE COMPARATIVE ENTRE TROIS LOGICIELS DE TRAITEMENT D'IMAGE (2 SEMI-AUTOMATIQUES ET 1 AUTOMATIQUE)

II.1 Comparaison entre le scanner et le microscope concernant l'acquisition des images (Figure 33)

Les résultats généraux (moyenne \pm SE) présentés dans le tableau 14 et la figure 33 ont montré la comparaison entre le scanner des lames et les différents grossissements microscopique (Gx10, Gx20, Gx25 et Gx40) à différents âges de croissance de la race poulet de chair étudié :

II.1.1 Scanner des diapositives

Dans cette comparaison, il a été révélé que le nombre moyen de fibres musculaires dénombrées dans les images segmentées par le groupe Cytoinformatics était toujours supérieur à 600, variant entre 780 et 990 fibres par image aux âges J0, J35, J42, J49 et J56 post-éclosion, et entre 600 et 655 fibres par image aux âges J7, J14, J21 et J28.

II.1.2 Le microscope

L'acquisition avec un grossissement x100 était impossible à l'âge J0, car les cellules musculaires sont de très petite taille. Aux âges J7 et J14, le nombre moyen de fibres musculaires était d'environ 840 par image. Ce nombre a ensuite diminué pour atteindre une moyenne de 550 fibres par image aux âges de J21 et J28, et a encore diminué pour se stabiliser entre 300 et 220 fibres par image aux âges de J35, J42, J49 et J56 (Tableau 11).

Le grossissement x200 a révélé un nombre moyen élevé de 950 fibres par image à l'âge de J0 post-éclosion. Ce nombre a chuté directement aux âges de J7 et J14 pour varier entre 230 et 250 fibres par image. À l'âge de J21 et J28, le nombre moyen de fibres par image variait entre 160 et 120, pour ensuite descendre à moins de 80 aux âges de J35, J42, J49 et J56. Presque les mêmes observations ont été constatées avec le grossissement x250, où nous avons enregistré des nombres moyens de fibres par image inférieurs à ceux capturés par le grossissement x200, allant de 10 à 50 fibres par image de moins (Tableau 11).

L'acquisition avec un grossissement x400 a montré des images avec un nombre moyen de cellules variant de 230 à l'âge de J0 post-éclosion, qui a chuté directement pour atteindre un nombre moyen variant entre 65 et 30 cellules par image aux âges de J7, J14, J21 et J28. Ce nombre moyen n'a pas dépassé les 20 fibres par image aux âges suivants.

Tableau 11: Multiples comparaisons du nombre des fibres musculaires entre le scanner des diapositives et les différents grossissements microscopiques (Gx10, Gx20, Gx25 et Gx40) à différents âges de croissance de poulet de chair.

Jour		Type d'acquisition					Valeur de P
		M x10	M x20	M x25	M x40	SC	
		Moyenne ± ES	Moyenne ± ES	Moyenne ± ES	Moyenne ± ES	Moyenne ± ES	
Nombre de fibres	0	. ¹	950.00±70.56 ^a	901.67±60.99 ^a	233.33±39.40 ^b	795.67±64.78 ^a	0.0001
	7	837.00±56.40 ^a	227.00±20.03 ^b	202.40±10.94 ^b	64.20±9.39 ^c	626.20±44.83 ^a	0.0001
	14	839.00±112.07 ^a	253.00±23.77 ^b	246.17±20.13 ^b	66.83±10.19 ^c	623.33±65.70 ^a	0.0001
	21	559.50±50.19 ^a	161.50±21.05 ^b	142.38±18.33 ^b	40.88±3.89 ^c	612.88±70.88 ^a	0.0001
	28	538.11±59.37 ^a	122.56±9.41 ^b	118.22±8.21 ^b	29.56±2.58 ^c	653.67±131.42 ^a	0.0001
	35	295.43±20.54 ^a	77.57±7.33 ^b	69.43±6.32 ^b	17.57±1.93 ^c	867.29±131.84 ^d	0.0001
	42	329.75±16.68 ^a	79.25±3.99 ^b	76.63±6.43 ^b	18.00±1.66 ^c	988.25±46.34 ^d	0.0001
	49	290.63±19.01 ^a	69.25±4.03 ^b	58.00±6.12 ^b	14.63±1.87 ^c	888.00±90.99 ^d	0.0001
	56	222.57±17.15 ^a	57.86±4.46 ^b	45.57±3.10 ^b	11.86±0.76 ^c	780.14±82.66 ^d	0.0001
	Moyenne	467.71±32.8 ^a	201.31±32.2 ^b	187.25±30.6 ^b	49.72±8.6 ^c	765.20±33.5 ^d	0.0001

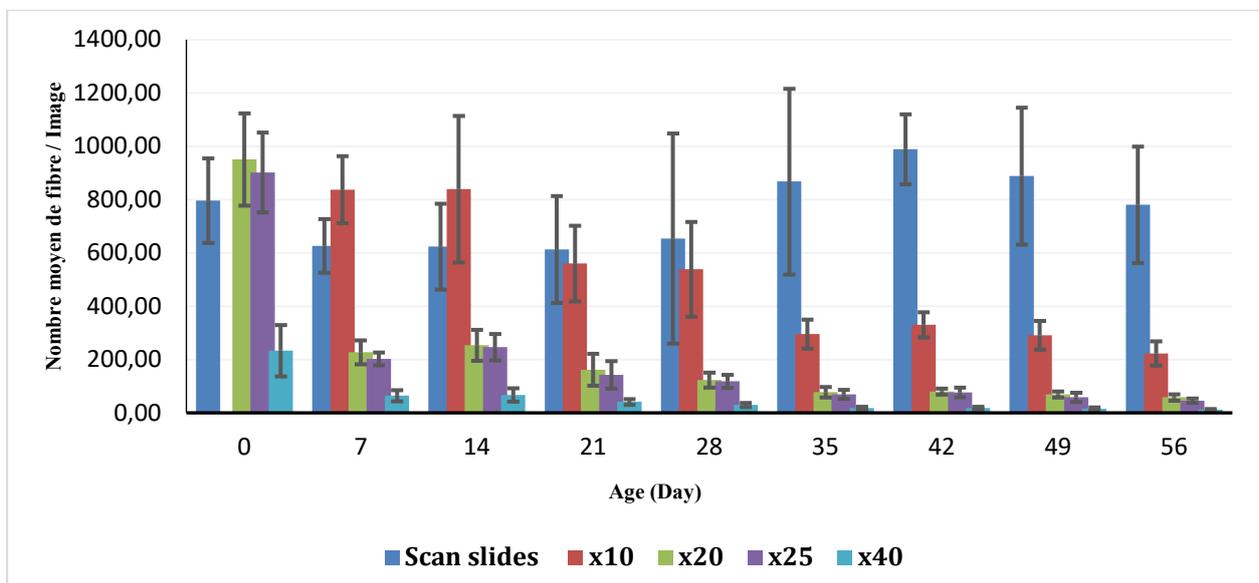


Figure 33: Comparaison des valeurs du nombre moyen des fibres musculaires dans 9 images acquises avec les grossissements x100, x200, x250, x400 du microscope avec celles dans des images scannées par un scanner des lames de marque Leica et segmentées par Cytoinformatics LLC aux différents âges d'étude (NB : la prise des images a été réalisée dans les mêmes endroits).

La multiple comparaison a révélé une différence significative entre le scanner des lames et les différents grossissements de microscopie optique en ce qui concerne le nombre de fibres ($P < 0,0001$, Tableau 11). La lame numérisée a montré la détection la plus élevée du nombre moyen de fibres ($765 \pm 33,5$) par rapport à différents grossissements microscopiques moyens ; ceux-ci étaient consécutivement, x100 ($468 \pm 32,8$), x200 ($201 \pm 32,2$), x250 ($187 \pm 30,6$) et x400 ($50 \pm 8,6$). Les comparaisons multiples étaient également significatives ($P < 0,0001$, Tableau 11) entre le scanner de diapositives et différents grossissements de microscopie optique à différents stades d'âge. Comme souligné dans le Tableau 11, le nombre de fibres détectées dans les images de coupe musculaire diminue progressivement en fonction de l'âge en utilisant les différents grossissements de microscopie optique ($P < 0,0001$, Tableau 11) ; cependant, il y a une légère augmentation des fibres en fonction de l'âge détectée par le scanner des lames ($P < 0,038$, Tableau 11).

Comme le montre le Tableau 11, le grossissement x200 ($950 \pm 70,5$) a montré le plus grand nombre de fibres détectées à l'âge d'éclosion (J0), suivi de x250 ($902 \pm 61,0$), puis par le scanner des diapositives ($796 \pm 65,0$), pour le grossissement x100, il était impossible d'identifier le nombre de fibres à l'âge d'éclosion. Par contre, ce dernier grossissement (x100) a une meilleure détection du nombre de fibres par rapport au scanner des lames à J7 ($837 \pm 56,4$ vs $626 \pm 44,8$) et J14 ($839 \pm 112,0$ vs $623 \pm 65,7$), Il n'y avait pas de différence significative entre le grossissement x200 et x250 à différents stades d'âge. On peut voir qu'un grossissement x400 a montré la plus faible détection du nombre de fibres à différentes catégories d'âge.

II.2 Comparaison entre trois logiciels (Cytoinformatics, Fiji et Image Pro Plus 10) concernant la segmentation

Pour obtenir une segmentation complète, deux étapes ont été réalisées afin d'améliorer la qualité de l'image finale par la séparation des cellules pour individualiser les fibres et la suppression des artefacts et des tissus non pertinents.

II.2.1 Première étape de la segmentation (individualisation des fibres)

Le temps de segmentation des 9 images choisies n'a pas été donné par le groupe Cytoinformatics puisqu'elles ont été segmentées avec l'ensemble des images de notre travail. Le temps était exprimé en heures, minutes et secondes (heure : minute : seconde) dans le Tableau 12 et la Figure 34.

Il y avait un effet significatif du type de logiciel sur le temps requis pour le post-traitement ($P < 0,021$, Tableau 12). Comme indiqué dans le tableau 15, il y avait une différence de temps estimé pour l'individualisation des fibres entre IP et FDP. De plus, IP (temps moyen, 1:18:06) a montré le temps de segmentation le plus bas à des stades d'âge consécutifs, suivi de FM (temps moyen, 2:39:05) et finalement le temps le plus long a été observé en FDP (temps moyen, 3:02:46). D'après la figure 34, on peut voir que le temps nécessaire à l'individualisation des fibres diminue avec l'âge jusqu'à 28 jours, où il y a une légère augmentation de 35 à 42 jours pour diminuer après dans les derniers âges de l'étude.

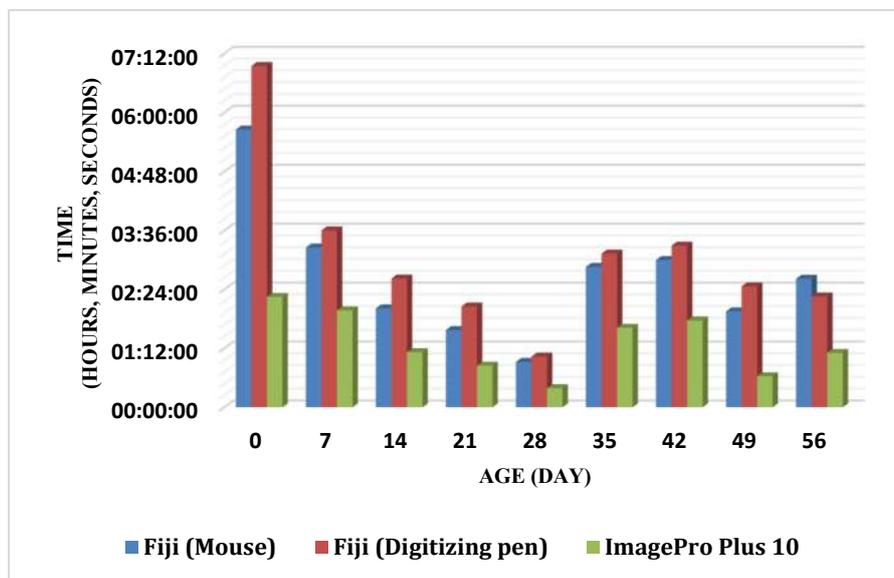


Figure 34: Le temps nécessaire pour la segmentation des 9 images par les deux logiciels Fiji (FDP, FM) et Image Pro Plus 10 (IP).

II.2.2 Deuxième étape (post traitement des images segmentées)

Le temps estimé pour le post traitement des images segmentées par Fiji avec le stylo numériseur (en heures : minutes : secondes) est presque le même pour les images segmentées par Fiji avec la souris (les différences ne dépassant pas 3 minutes). Les 9 images segmentées par IP ont été vérifiées de nouveau par Fiji pour éliminer les tissus non pertinents, les artefacts et les cellules non segmentées, ce qui a nécessité un temps supplémentaire. Il y avait un effet significatif du type de logiciel sur le temps requis pour le post-traitement ($P < 0,0009$, Tableau 12).

Comme le montre le Tableau 2, il y avait une différence de temps estimée pour le post-traitement entre IP et CytoF et FDP. De plus, CytoF a le temps le plus court nécessaire pour le post-traitement (temps moyen, 0:10:00) et IP le plus élevé (temps moyen, 0:40:31). D'après la

figure 35, on peut noter que le temps nécessaire au post-traitement des images segmentées diminue avec l'âge jusqu'à 28 jours, où il y a une augmentation de 35 à 42 jours.

Tableau 12: Nombre total des fibres après segmentation, le temps requis pour l'individualisation des fibres et l'évolution du temps nécessaire pour le post traitement des images en fonction de l'âge par l'utilisation de 3 logiciels (Fiji « FDP, FM », IP et CytoF)

Nombre total des fibres musculaires										
	D0	D07	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	Mean±SE
FM	737	534	736	401	334	714	1017	422	620	612.78±71.6 4 ^a
FDP	732	528	735	409	338	703	1015	435	635	614.44±70.2 5 ^a
IP	717	530	746	401	343	726	1026	408	622	613.22±72.5 2 ^a
Cyto F	706	517	751	416	348	734	1048	448	645	623.66±72.3 6 ^a
P	0.999									
Temps nécessaire pour l'individualisation des fibres										
	D0	D07	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	Mean±SE
FM	5:39: 20	3:15: 17	2:01: 01	1:34: 24	0:55: 32	2:51: 40	3:00: 01	1:57: 16	2:37: 16	2:39:05±0.02 ab
FDP	6:57: 00	3:36: 19	2:37: 30	2:03: 13	1:01: 58	3:07: 56	3:17: 42	2:27: 47	2:15: 33	3:02:46±0.02 a
IP	2:15: 03	1:58: 27	1:07: 16	0:50: 49	0:23: 16	1:37: 10	1:46: 12	0:38: 04	1:06: 38	1:18:06±0.01 b
P	0.021									
Temps nécessaire pour le post traitement										
	D0	D07	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	Mean±SE
FM	0:24: 31	0:28: 50	0:15: 31	0:17: 14	0:07: 46	0:28: 48	0:42: 55	0:41: 21	0:23: 24	0:25:36±0.00 3 ^{ab}
FDP	0:25: 29	0:27: 15	0:16: 14	0:17: 35	0:09: 52	0:30: 31	0:41: 56	0:41: 05	0:25: 56	0:26:13±0.00 2 ^a
IP	1:19: 13	1:09: 41	0:26: 52	0:31: 40	0:13: 37	0:20: 38	0:50: 09	0:35: 52	0:36: 55	0:40:31±0.00 5 ^b
Cyto F	0:26: 31	0:11: 13	0:03: 35	0:05: 37	0:03: 56	0:07: 31	0:09: 29	0:10: 46	0:11: 26	0:10:00±0.00 2 ^a
P	0.0009									

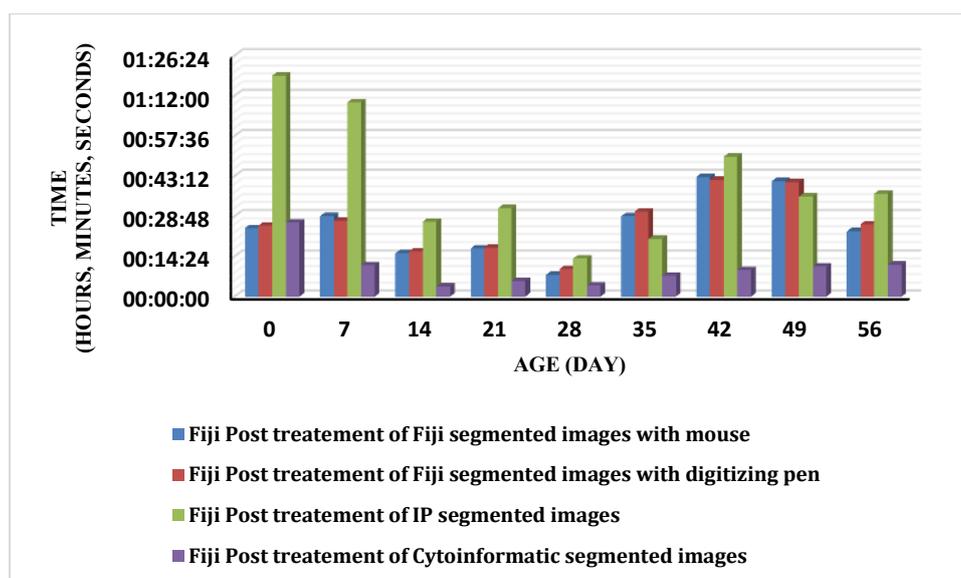


Figure 35: Le temps nécessaire (heures : minute : seconde) pour le post traitement avec Fiji des 9 images segmentées par Fiji (stylo numériseur, souris), Image Pro Plus 10 (IP) et Cytoinformatics LLC pour obtenir des images bien segmentées sans fibres touchantes et sans artefacts.

II.2.3 Du point de vue du calcul des paramètres des fibres musculaires

II.2.3.1 Comparaison du nombre total des fibres musculaires obtenues après segmentation avec les trois logiciels

La comparaison de la segmentation des 9 images avec les trois logiciels, du point de vue du nombre total de fibres par image, a montré que ce dernier varie légèrement d'un logiciel à l'autre ($P < 0,999$, Tableau 12, Figure 36) et d'un âge à l'autre, avec des variations ne dépassant pas 35 fibres entre les 4 techniques de segmentation pour le même âge, sauf à l'âge J49 où le nombre de cellules obtenu par la segmentation IP a montré un chiffre un peu bas. Le nombre total de fibres musculaires calculé après segmentation était approximativement égal pour différentes catégories d'âge en utilisant les 3 logiciels ($P < 0,999$, Tableau 12). Le nombre moyen de fibres à tous les stades d'âge était respectivement de 612, 614, 613 et 623 pour FM, FDP, IP et CytoF (la différence ne dépassait pas 11 fibres). Notons que le logiciel du groupe Cytoinformatics est le plus performant car il a pu segmenter et compter la plupart des fibres par rapport à l'image réelle.

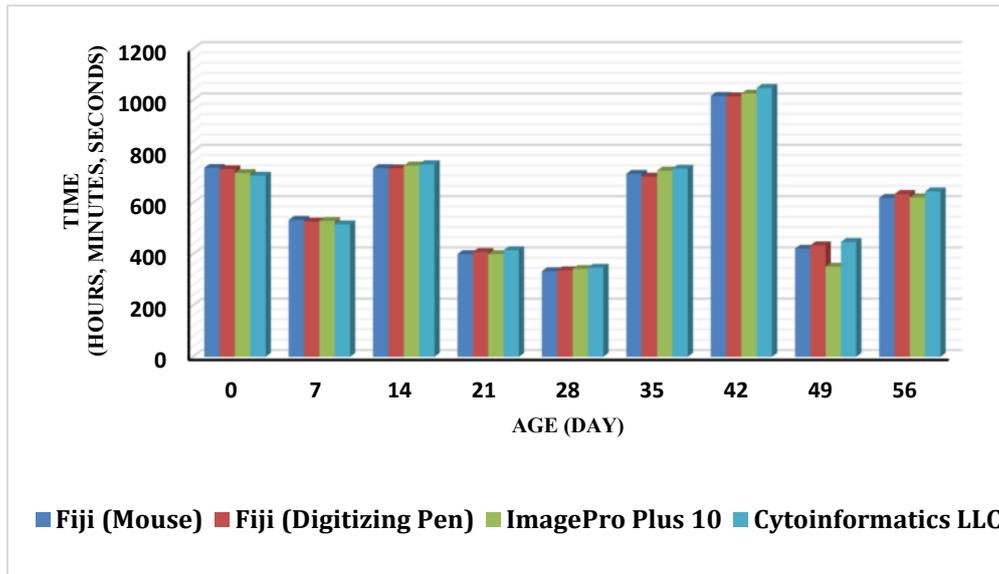


Figure 36: Nombre de fibres obtenues après segmentation avec les trois logiciels.

II.2.3.2 Comparaison de l'Aire de Section Transversale (AST) moyenne, Diamètre Moyen de Feret (DMF) et périmètre des fibres musculaires obtenues après segmentation avec les trois logiciels (Figures 37, 38 et 39)

Les trois histogrammes des paramètres calculés (AST, DMF et périmètre) ont montré que la segmentation effectuée par Fiji (avec un stylo numériseur interfacé à un ordinateur) (FDP) a donné les moyennes les plus élevées et les plus précises dans la quasi-totalité des âges étudiés, suivie respectivement par la segmentation réalisée par Fiji avec souris (FM), Cytoinformatics LLC et IP, malgré la similarité de leurs résultats. En revanche, la comparaison entre les quatre types de segmentation pour les paramètres mesurés par le test multiple comparaison (Tableau 10) a révélé :

II.2.3.2.1 Pour le paramètre Aire de Section Transversale (AST)

Il existe une différence significative entre les 3 logiciels dans le calcul de l'AST à différents âges ($P < 0,0001$, Tableau 103), seulement à 42 jours, aucun effet du type de logiciel n'a été observé ($P < 0,349$, Tableau 103). De plus, IP présente des différences plus significatives selon les tranches d'âge et la valeur d'AST moyenne la plus faible par rapport aux autres logiciels ($1743,16 \pm 17,82$, Tableau 103). Les résultats obtenus à partir de l'analyse du Tableau 16 ont démontré que FM et FDP ont montré les valeurs les plus élevées d'AST moyen ($1863,61 \pm 19,44$ et $1869,47 \pm 18,57$, respectivement), suivis de CytoF ($1833,77 \pm 18,92$). Ces derniers n'ont montré aucune différence significative en comparaison.

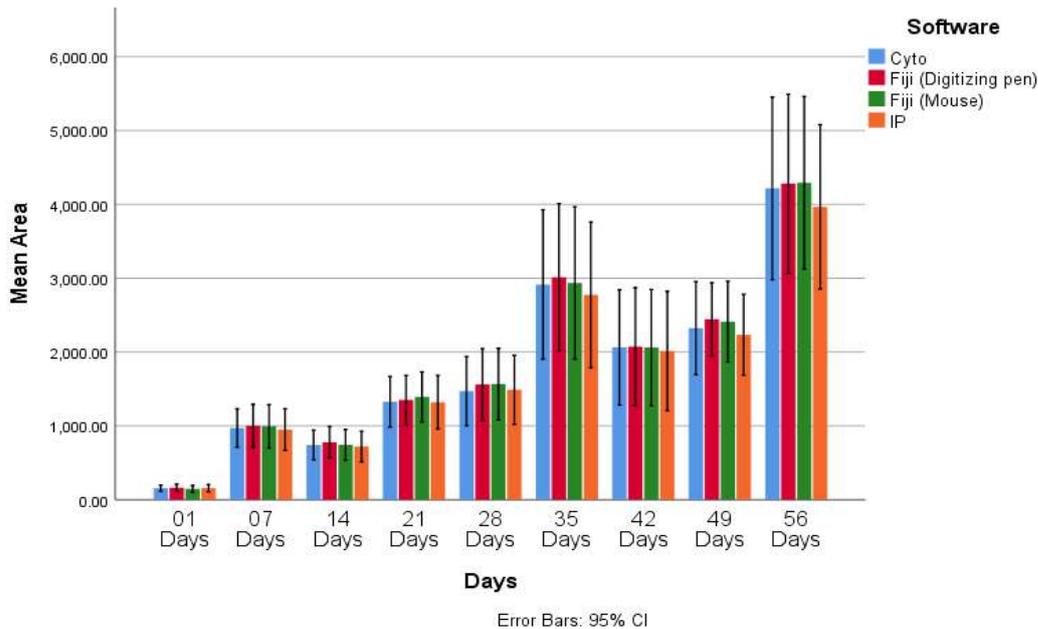


Figure 37: Surface moyenne des fibres musculaires (μm^2) calculée par Fiji après segmentation par les trois logiciels.

II.2.3.2.2 Pour le paramètre Périmètre

Les résultats ont montré une différence significative entre les 3 logiciels pour la mesure du périmètre à différents stades d'âge ($P < 0,0001$, Tableau 103). Indépendamment de l'âge, un examen plus approfondi du Tableau 103 a montré que des différences significatives ont été principalement observées entre FM et FDP, et IP. Comme le montre le Tableau 103, il n'y a pas de différence significative entre FM et FDP et ils ont détecté les valeurs moyennes les plus élevées du périmètre ($171,83 \pm 1,04$ et $171,84 \pm 0,99$, respectivement) suivies de CytoF ($166,01 \pm 0,99$). De plus, IP a montré la valeur moyenne la plus basse du périmètre avec plus de différence par rapport aux autres logiciels ($159,45 \pm 0,93$).

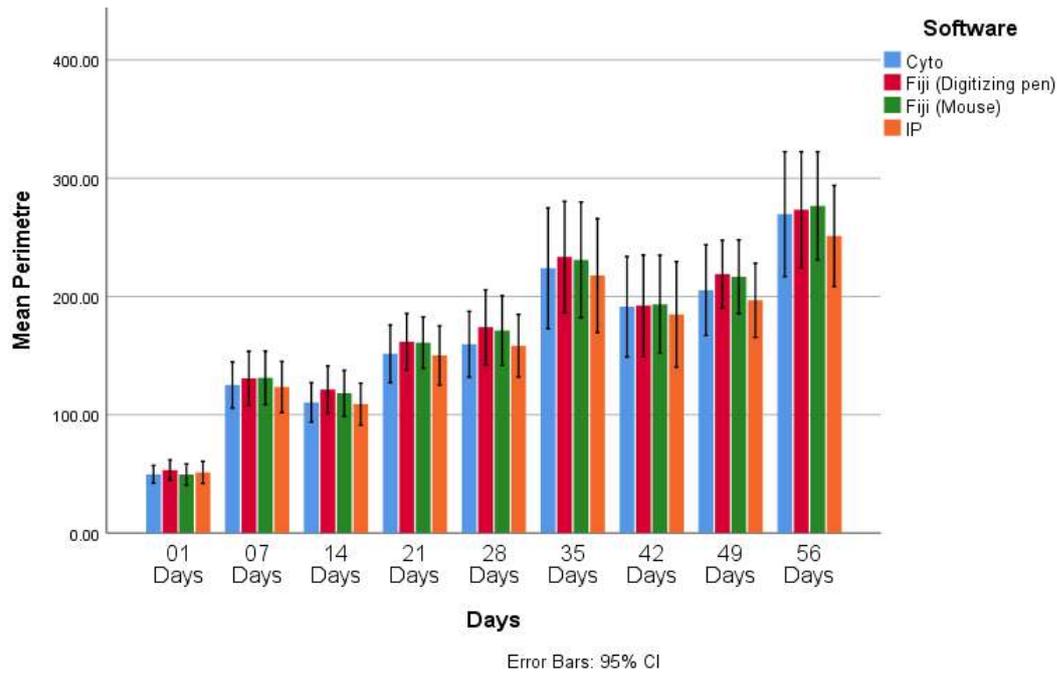


Figure 38: Périmètre moyen (μm) calculé par Fiji après segmentation par les trois logiciels.

II.2.3.2.3 Pour le paramètre Diamètre Moyen de Feret (DMF)

Les résultats ont montré une différence significative du DMF entre les 3 logiciels en fonction de l'âge ($P < 0,0001$, Tableau 13). Les résultats obtenus à partir de l'analyse du Tableau 13 ont montré que FM et FDP ont présenté les valeurs moyennes les plus élevées de DMF sans différence significative entre elles ($38,91 \pm 0,24$ et $38,98 \pm 0,22$ respectivement). De plus, IP et CytoF ont montré les valeurs les plus basses de DMF sans différence en comparaison ($37,20 \pm 0,22$ et $37,24 \pm 0,23$, respectivement).

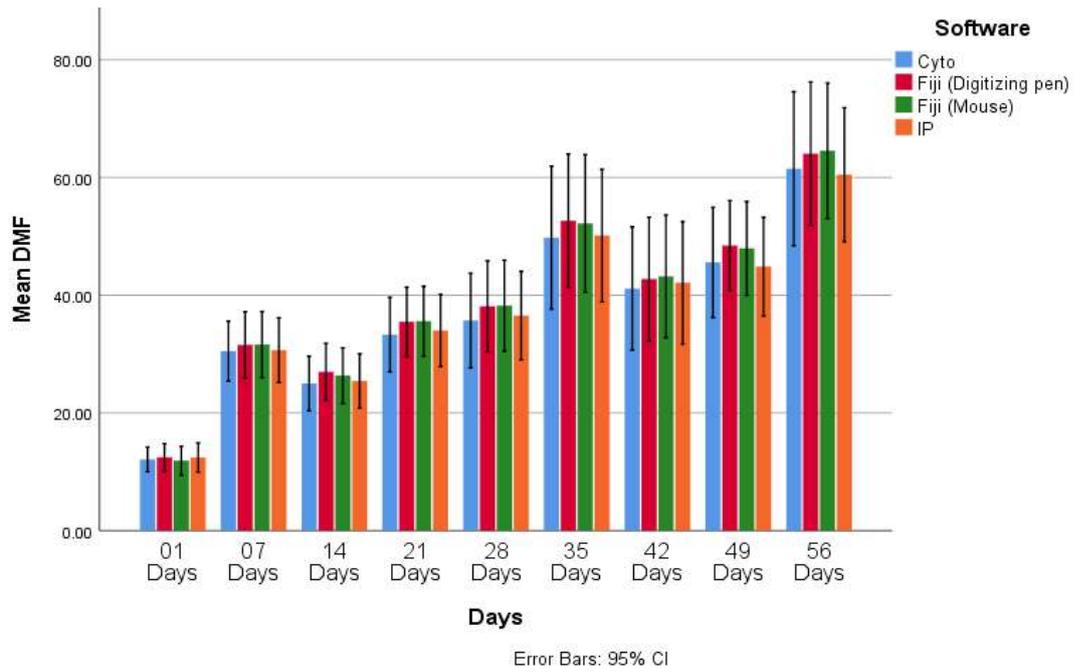


Figure 39: Diamètre moyen de Feret (DMF) moyen (μm) calculé par Fiji après segmentation par les trois logiciels

Tableau 103: Multiples comparaisons à différents stades d'âge pour les morphométries des fibres (AST, périmètre, DMF) entre les images segmentées FDP, FM, CytoF et IP (n = 63).

Paramètres de fibres	Age (Jours)	Logiciels				Valeur de P
		FDP	FM	CytoF	IP	
		Moyenne ± ES	Moyenne ± ES	Moyenne ± ES	Moyenne ± ES	
AST	1	162.28±1.78 ^b	145.59±1.73 ^c	155.52±1.59 ^a	156.00±1.88 ^{a, b}	0.000
	7	999.96±12.73 ^a	993.99±16.08 ^{a, b}	970.56±11.45 ^{a, b}	949.16±12.26 ^b	0.017
	14	778.65±7.86 ^b	743.45±7.69 ^a	740.91±7.32 ^a	718.89±7.66 ^a	0.000
	21	1350.73±16.43 ^{a, b}	1390.82±16.91 ^b	1326.78±16.76 ^a	1319.65±18.02 ^a	0.015
	28	1560.76±26.46 ^a	1565.06±26.69 ^a	1470.06±25.15 ^a	1487.48±25.26 ^a	0.013
	35	3013.37±37.61 ^a	2934.64±38.69 ^a	2914.07±37.40 ^a	2774.29±36.66 ^b	0.000
	42	2072.81±25.10 ^a	2060.46±24.68 ^a	2063.37±24.14 ^a	2014.60±25.27 ^a	0.349
	49	2443.28±23.81 ^b	2411.41±26.67 ^{a, b}	2323.36±29.80 ^{a, c}	2234.13±29.23 ^c	.000
	56	4280.97±48.05 ^a	4292.66±47.02 ^a	4216.67±48.80 ^a	3966.59±44.63 ^b	0.000
	Moyenne	1869.47±18.57 ^a	1863.61±19.44 ^a	1833.77±18.92 ^a	1743.16±17.82 ^b	0.000
Périmètre	1	53.14±0.32 ^b	49.35±0.33 ^a	49.57±0.28 ^a	51.15±0.34 ^c	0.000
	7	130.77±0.99 ^b	131.17±1.24 ^b	125.14±0.85 ^a	123.45±0.93 ^a	0.000
	14	121.21±0.74 ^b	118.12±0.71 ^c	110.40±0.60 ^a	108.94±0.65 ^a	0.000
	21	161.78±1.18 ^b	160.96±1.08 ^b	151.54±1.19 ^a	150.11±1.24 ^a	0.000
	28	174.02±1.72 ^b	171.16±1.61 ^b	159.64±1.49 ^a	158.33±1.43 ^a	0.000
	35	233.43±1.77 ^b	230.90±1.83 ^b	223.82±1.88 ^a	217.71±1.78 ^a	0.000
	42	192.18±1.34 ^a	193.46±1.30 ^a	191.33±1.31 ^a	184.88±1.39 ^b	0.000
	49	218.97±1.37 ^b	216.72±1.52 ^b	205.29±1.81 ^a	196.80±1.67 ^c	0.000
	56	273.44±1.94 ^a	276.59±1.84 ^a	269.62±2.08 ^a	251.23±1.71 ^b	0.000
	Moyenne	171.84±0.99 ^b	171.83±1.04 ^b	166.01±0.99 ^a	159.45±0.93 ^c	0.000
DMF	1	12.45±0.08 ^b	11.87±0.09 ^a	12.09±0.07 ^a	12.43±0.09 ^b	0.000
	7	31.56±0.24 ^b	31.60±0.30 ^{b, c}	30.48±0.22 ^a	30.66±0.23 ^{a, c}	0.001

	14	26.97±0.17 ^b	26.34±0.17 ^b	24.98±0.16 ^a	25.41±0.16 ^a	0.000
	21	35.47±0.29 ^b	35.57±0.29 ^b	33.29±0.31 ^a	34.00±0.30 ^a	0.000
	28	38.10±0.42 ^{b,c}	38.21±0.42 ^b	35.69±0.43 ^a	36.53±0.40 ^{a,c}	0.000
	35	52.66±0.42 ^b	52.19±0.43 ^b	49.79±0.44 ^a	50.12±0.41 ^a	0.000
	42	42.74±0.33 ^b	43.20±0.32 ^b	41.13±0.32 ^a	42.10±0.32 ^{a,b}	0.000
	49	48.44±0.36 ^b	47.95±0.38 ^b	45.57±0.44 ^a	44.85±0.44 ^a	0.000
	56	64.05±0.48 ^b	64.54±0.46 ^b	61.49±0.516 ^a	60.46±0.45 ^a	0.000
	Moyenne	38.98±0.22 ^b	38.91±0.24 ^b	37.24±0.23 ^a	37.20±0.22 ^a	0.000

Multiple comparaisons Tukey HSD. P < 0,05.

Abréviations : FM : Fiji Mouse ; FDP : Fiji Stylo Numériseur ; IP : Image Pro Plus 10 ; CytoF : Cytoinformatique LLC ; AST : Aire de Section Transversale ; DMF : Diamètre Minimal de Feret.

a-c Des comparaisons sont faites dans la ligne concernant les paramètres de fibre entre différents logiciels de segmentation en utilisant des lettres en exposant.

DISCUSSION

L'étude de la biologie musculaire repose sur des déterminismes physiologiques (de type métabolique ou contractile) et morphologiques (nombre, AST, DMF et périmètre). Les images traitées enregistrées à partir de coupes histologiques et histoenzimologiques des muscles sont les meilleures méthodes pour explorer ces déterminismes. L'étude présente, décrit une étude histologique et histochimique des fibres musculaires de trois muscles (Ps, Sart et ALD) pour le calcul de leurs paramètres morphométriques ainsi que les étapes du traitement de l'image musculaire, qui sont successivement, l'acquisition de l'image, la segmentation (détermination des morphométries) et la typologie des fibres (détermination du type contractile).

I. ÉTUDE HISTOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE DES MUSCLES ETUDIÉS

I.1 Calcul du poids vif des poulets et le poids des muscles concernés pour chaque âge d'étude

Les taux de croissance les plus élevés des sujets étudiés sont observés dans les deux premières semaines d'âge, étant donné que les processus de développement et de maturation des fibres musculaires sont extrêmement précoces et importants durant cette période selon (Bigot et al., 2001). Ce taux a connu une diminution progressive jusqu'à la valeur la plus basse à la septième semaine 10,98 pour remonter après à une valeur de 27,05 et cela est dû au fait que nos animaux choisis à l'âge de 42 et 49 jours sont plus lourds et plus légers respectivement.

I.2 Etude des paramètres morphométriques des fibres musculaires pour chaque muscle étudié

I.2.1 Nombre total des fibres musculaires (nbFT)

Dans notre étude, contrairement à ce qui a été mentionné dans la partie bibliographique, le calcul du nombre total de fibres a été réalisé sur le muscle ALD en raison de sa petite taille, ce qui nous a permis de réaliser une coupe transversale complète sur une seule lame pour tous les âges étudiés. Cela a été possible grâce aux nouvelles technologies de traitement d'images qui nous ont permis de visualiser toutes les coupes transversales de ce muscle à partir d'images enregistrées sur des lames virtuelles.

Le nbFT a augmenté de J0 à J7, passant de 4851 à 5467. Cette augmentation semble contradictoire avec ce qui a été précédemment établi, étant donné qu'il est généralement admis que le nombre de fibres musculaires chez les poulets est établi avant l'éclosion. Ainsi, toute augmentation de la masse musculaire post-éclosion dépend de la croissance radiale et longitudinale des fibres musculaires (Chen et al., 2007). Cette observation a été démontrée dans plusieurs espèces, notamment chez le porc (Swatland, 1973), le poulet (Gollnick et al., 1983 ; Swatland, 1984 ; Remignon, 1993), le rat (Rosenblatt & Woods, 1992 ; Schadereit et al., 1995), les bovins (Wegner et al., 2000) et chez l'homme (Klein et al., 2003). Cette augmentation du nombre total de fibres (nbFT) de J0 post-éclosion à J7 pourrait s'expliquer par la maturation et l'allongement des myotubes existants plutôt que par la production de nouvelles fibres. Ces myotubes sont difficiles à compter à J0 post-éclosion en raison de leur petite taille, que le logiciel de traitement d'image ne parvient pas à détecter. Nos résultats viennent confirmer les suspicions de Rehfeldt et al. (2000) concernant les augmentations du nbFT dans les muscles des rongeurs.

Cependant, Edman et al. (1988) ont réalisé des coupes transversales et longitudinales d'un même fragment, au même endroit, afin de contrôler les zones de transition entre les parties rouges et blanches du muscle Ps chez le poulet adulte. On peut utiliser cette image pour expliquer l'augmentation du nombre de fibres entre le premier jour post-éclosion et le septième jour, du fait que toutes les fibres de petite taille comme 6, 12 et 14 ne sont pas encore bien allongées et matures à J0 post-éclosion (Figure 40). Cependant, elles deviennent visibles et détectables à J7 par le logiciel, ce qui pourrait expliquer une différence moyenne de 616 fibres entre ces deux âges étudiés.

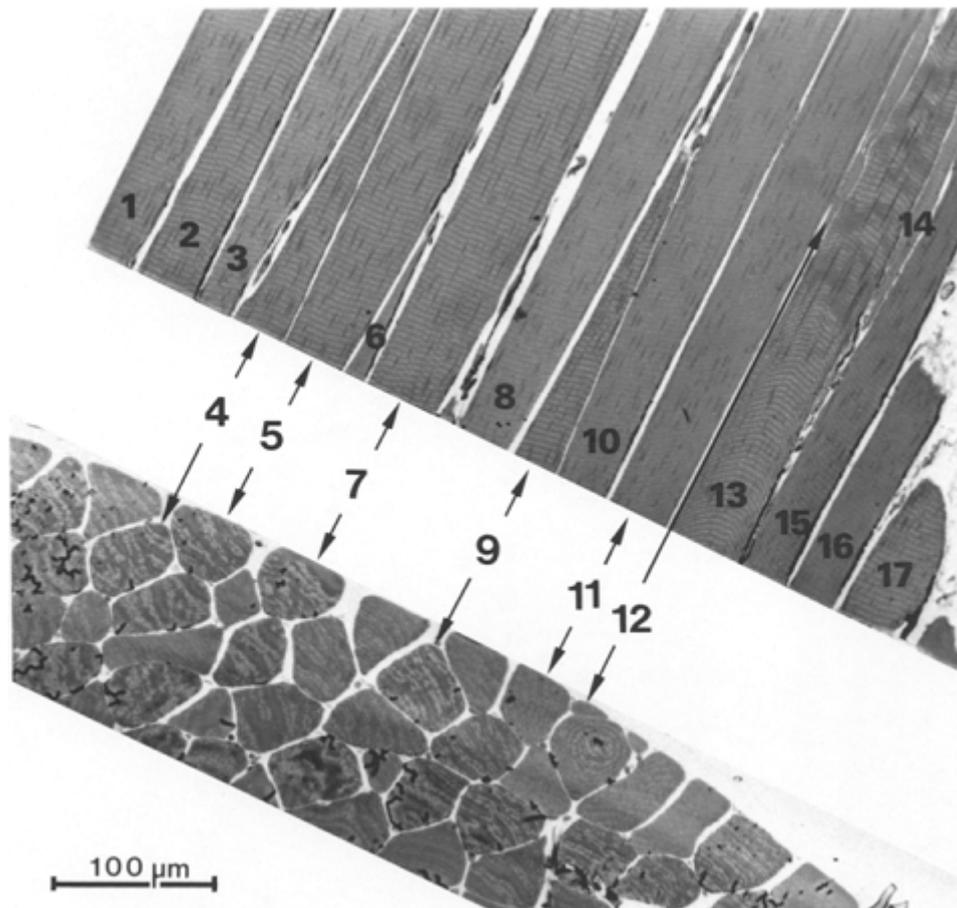


Figure 40: Coupe transversale d'un muscle enrobé de plastique (en bas à gauche). Le bloc spécimen a été ensuite tourné de 90° pour donner la coupe longitudinale (en haut à droite) des mêmes fibres (1 à 17). x 175. Barre = 100 µm

Le nbFT reste stable aux alentours de 5000 fibres jusqu'à J28 pour diminuer progressivement pour marquer la plus basse valeur (4211 fibres musculaires) à J56. Nos résultats sont en concordance avec les recherches de Grimby et Saltin (1983) qui ont constaté une diminution du nombre de fibres musculaires (nbFT) chez l'homme de la naissance jusqu'à l'âge adulte. Ces résultats sont également appuyés par les travaux de Rehfeldt et al. (1999) ainsi que Thompson (2002), qui ont trouvé que le nombre total de fibres musculaires diminue considérablement avec l'âge, à partir d'environ 25 ans, et progresse à un rythme accéléré par la suite. Alors que notre travail n'est pas en accord avec Remignon (1993), qui a confirmé une différence dans le nombre de fibres entre deux souches de croissance rapide et lente en faveur de la première souche, il a constaté une stabilité du nombre total des fibres jusqu'à un an d'âge chez les deux souches. Cela pourrait être dû aux techniques de traitement d'image utilisées à cette époque, qui étaient basées sur le microscope comme outil pour la prise des images.

Contrairement à ce qui a été mentionné précédemment, les travaux de Klein et al. (2003) ont estimé que le nombre de fibres musculaires n'était pas significativement différent entre les jeunes hommes et les personnes âgées pour le biceps brachial. Par conséquent, la vieillesse n'est pas associée à une réduction du nombre de fibres musculaires dans ce muscle, et la diminution du nombre de fibres lors de l'atrophie musculaire liée à l'âge pourrait dépendre du muscle spécifique. Bérard et al. (2011) sont allés plus loin en suggérant que le nombre de fibres musculaires totales (nbFT) dans les muscles du porc n'est pas fixé à la naissance, et que son augmentation postnatale peut être liée à la fois à l'allongement des fibres musculaires existantes et à la formation de nouvelles myofibres tertiaires, principalement entre la naissance et l'âge de 3 semaines.

I.2.2 Comptage de l'Aire de Section Transversale (AST)

Que ce soit chez le porc (Henckel et al., 1997 ; Lee et al., 2016), le bovin (Brandstetter et al., 1997), le rat (Ceglia et al., 2013), la souris (Kammoun et al., 2014), ou le poulet (Koomkrong et al., 2015), chez les races modifiées génétiquement ou non (Cotrel, 2004 ; Jaturasitha et al., 2008 ; Picard & Gagaoua, 2020), l'augmentation de la vitesse de croissance des animaux avec l'âge est associée à une augmentation de l'AST des fibres musculaires. Pour l'ensemble de ces auteurs, c'est l'augmentation de l'AST qui constitue l'événement majeur exclusif, responsable du gain de poids du muscle observé. Une des illustrations possibles de ces faits est donnée par l'analyse des corrélations positives étroites entre l'AST des cellules musculaires et le poids du muscle (Remignon, 1993).

Peu de recherches ont suivi la croissance musculaire chronologiquement d'un point de vue histoenzymologique en raison de la difficulté de réalisation des coupes histologiques et de traitement d'image du tissu musculaire. Les espèces aviaires sélectionnées sur le critère de croissance élevée se caractérisent par un développement musculaire important dès la première semaine de vie. Ce processus de développement et de maturation des fibres musculaires, important chez le poulet de chair, est extrêmement précoce, limité dans le temps, et les deux premiers jours semblent être une période cruciale pour le développement musculaire du poussin (Bigot et al., 2001).

Dans notre étude, l'AST des myocytes est multipliée par 17 - 5,70 – 5,77 pour les muscles Ps (de 22,86 μm^2 à 389,10 μm^2), Sart « M et R » (de 62,06 μm^2 à 354,23 μm^2) et ALD (de 143,88 μm^2 à 830,35 μm^2) respectivement entre J0 et J7 chez cette race de poulet (Hubbard). Remignon (1993), dans une étude comparative entre deux races de poulet, l'une à croissance

légère et l'autre à croissance rapide, a constaté une absence d'augmentation de l'AST entre zéro ($23 \mu\text{m}^2$) et une semaine ($27 \mu\text{m}^2$) pour la première race, alors qu'elle est multipliée par trois pour le muscle Ps (de $20 \mu\text{m}^2$ à $62 \mu\text{m}^2$) et par deux dans les muscles Sart et ALD pour la deuxième race. Cette augmentation spectaculaire de l'AST chez cette race étudiée (Hubbard) entre le jour d'éclosion et la première semaine pourrait être due à l'effet de la sélection génétique qui, ces dernières années, est basée surtout sur le rendement musculaire.

Huo et al. (2022) ont trouvé une valeur presque identique à notre résultat, soit $29,44 \mu\text{m}^2$ pour les fibres du Ps au premier jour post-éclosion chez une race à croissance rapide Ross 308. Par contre, Berri et al. (2003), dans une étude sur le muscle Ps dans une ligne contrôlée et une autre sélectionnée, ont trouvé des fibres musculaires avec une AST plus élevée à J0 ($91,3 \mu\text{m}^2$ et $104,2 \mu\text{m}^2$) pour les deux lignes précédentes respectivement. L'AST des fibres musculaires des muscles Ps et Sart a connu une augmentation régulière jusqu'à l'âge d'abattage, avec une légère diminution de l'AST à la huitième semaine parce que les sujets choisis à cet âge avaient un poids presque identique à ceux de la septième semaine.

À partir de J7 et jusqu'à l'âge de J56, les surfaces transversales des cellules musculaires des muscles Ps et Sart de notre recherche sont toujours supérieures à l'AST des myocytes des mêmes muscles dans les études suivantes : de la race à croissance rapide (X33) dans les travaux de Remignon (1993) aux âges J7, J14, J21, J35 et J77 ; de la race Arbor Acre dans une recherche de Chen et al. (2007) aux âges J1, J14, J28, J42 et J56 ; et de la ligne contrôlée dans le travail de Berri et al. (2003) aux âges J14, J28 et J42.

Des recherches montrent des valeurs supérieures à celles de nos travaux concernant la taille des fibres musculaires du muscle Ps, notamment : l'AST des fibres musculaires du Ps dans une ligne sélectionnée aux âges de J14, J28 et J42 dans les travaux de Berri et al. (2003) et dans les recherches de Berri et al. (2005) à l'âge de J42. La taille des fibres du muscle Ps dans les deux lignes Y33 (ligne sélectionnée sur huit générations pour son haut rendement en viande de poitrine et sa faible graisse abdominale) " $2184 \mu\text{m}^2$ " et Y11 (ligne non sélectionnée) " $2234 \mu\text{m}^2$ " est bien supérieure à la taille des fibres du même muscle " $1394 \mu\text{m}^2$ " de notre travail à l'âge de J49. L'effet de la sélection génétique a également ses répercussions sur les muscles de la patte puisque, comme on le verra ci-dessous, les trois types de fibres de la partie mixte du muscle Sart de la ligne Y33 ont une AST plus élevée que celles de notre recherche, contrairement à la ligne Y11.

Pour les deux parties Sart M et Sart R, les valeurs de l'AST aux âges de J0, J7, J14, J21, J35 et J56 pour les trois types de fibres (I, IIA et IIB) sont supérieures à celles des deux parties

du muscle Sart dans les travaux de Remignon (1993) aux âges de J0, J7, J14, J21, J35 et J77 respectivement.

Les mêmes observations s'appliquent aux fibres IIA, IIIA et IIIB du muscle ALD pour les mêmes âges précédents. À l'âge de J49, nos résultats concernant les fibres des deux parties du muscle Sart sont supérieurs à ceux de la ligne Y11 et inférieurs à ceux de la ligne Y33. Alors que la somme des moyennes des fibres I, IIA et IIB pour les deux parties du muscle Sart est supérieure à celle du même muscle dans les deux lignes contrôlée et sélectionnée de Berri et al. (2003) à J14 et J42, mais l'inverse est constaté à J28. Cela pourrait être dû à l'effet de la race, puisque chaque race sélectionnée génétiquement a ses propres vitesses de croissance qui varient avec l'âge d'une race à l'autre, ou bien cela pourrait être dû à l'effet de la variabilité interrégionale du même muscle, car notre étude porte sur les deux parties du muscle Sart (mixte et rapide), tandis que cette équipe a peut-être étudié le muscle Sart dans sa totalité et il n'est pas clair s'ils ont étudié la partie mixte ou la partie intermédiaire.

Le classement des fibres musculaires selon leurs AST de façon croissante a été trouvé dans notre travail comme suit : fibres I Sart ($616,31 \mu\text{m}^2$) → fibres IIA Sart ($930,07 \mu\text{m}^2$) → fibres IIB Ps ($986,47 \mu\text{m}^2$) → fibres IIA ALD ($1138,74 \mu\text{m}^2$) → fibres IIB Sart ($1143,70 \mu\text{m}^2$) → fibres IIIB ALD ($1723,48 \mu\text{m}^2$) → fibres IIIA ALD ($1769,12 \mu\text{m}^2$). Tandis que la moyenne de l'ensemble des fibres de chaque muscle a donné le classement suivant : Sart $658,06 \mu\text{m}^2$ → PS $986,74 \mu\text{m}^2$ → ALD $1193,80 \mu\text{m}^2$. La vision traditionnelle des différents types de fibres musculaires est que les fibres oxydatives lentes (Type I, SO) sont les plus petites en diamètre et les fibres glycolytiques rapides (FG) (Type IIB) sont les plus grandes (Kernell, 1998)

Nos résultats sont en accord avec ceux de Berri et al. (2005) sur le muscle Sart, où ils ont trouvé que l'AST des fibres augmente de I → IIA → IIB, que ce soit chez les mâles témoins, les femelles témoins, et même chez les femelles reversées sexuellement. Ils sont également en accord avec les résultats de Liu et al. (2013) sur les muscles soléaire et plantaire de souris, où les fibres de type I ont une petite taille, les IIA ont une taille moyenne, et les IIB ont une grande taille. Ils sont aussi en accord avec les travaux de Singh et al. (2002), qui ont signalé que les fibres de type FG (IIB) étaient généralement plus grandes que celles des fibres de type FOG (IIA) et SO (I) au sein du même muscle chez le singe *Macaca mulatta*. Mahon (1999) a rapporté que, à l'âge du marché, les fibres « rouges » de type I de la jambe ont un diamètre plus petit que les fibres de type IIA et IIB du muscle pectoral. Chen et al. (2007) ainsi que Choi et Kim (2009) ont également rapporté que la plupart des fibres glycolytiques ont la plus grande AST

par rapport aux autres types de fibres. Fuentes et al. (1998) ont prouvé que plus l'activité oxydative est importante, plus la taille des fibres musculaires est petite.

Nos résultats concernant le classement des fibres selon leur taille étaient toutefois sensiblement différents de ceux de Roy et al. (1984) chez le singe. Leur étude a montré que les fibres SO (I) étaient toujours plus grandes que les fibres FOG (IIA), elles-mêmes plus grandes que les fibres FG (IIB). McFarland et Meyers (2008) ont trouvé, chez deux types d'oiseaux de rivage, que les fibres lentes de plusieurs muscles de la patte étaient significativement plus grandes que les fibres rapides. Nos travaux ne sont pas non plus en accord avec les travaux d'Edman et al. (1988) qui ont cité, dans une étude sur des poulets adultes, une AST des fibres II ($1700 \mu\text{m}^2$) qui est plus petite que l'AST des fibres lentes I ($3800 \mu\text{m}^2$), bien qu'ils aient constaté que les fibres plus petites ont plus que la moyenne de chances d'être fortement oxydantes et que les fibres plus grandes sont souvent plus glycolytiques. Remignon (1993), dans son travail, a classé les différents types de fibres chez des poulets de croissance lente et rapide selon leur AST de façon croissante comme suit : IIA \rightarrow I \rightarrow IIB \rightarrow III. Certaines publications ont généralement classé les fibres du poulet selon la taille relative de la manière suivante : I (petit-moyen) \rightarrow IIA (moyen) \rightarrow IIB (moyen) \rightarrow IIIB (moyen) \rightarrow IIIA (large) (Bernard et al., 1982 ; Harvey & Marshall, 1998). Dans une étude sur les muscles du rat, Kammoun et al. (2014) ont également classé les fibres selon la taille croissante de l'AST comme suit : IIA ($992 \mu\text{m}^2$) \rightarrow IIX ($1116 \mu\text{m}^2$) \rightarrow I ($1187 \mu\text{m}^2$).

Il convient de noter que dans toutes ces exceptions à la « règle », les fibres glycolytiques étaient toujours les plus grandes, car les fibres oxydatives et les fibres oxydoglycolytiques tireraient un avantage de diffusion de leurs plus petites sections transversales (McFarland & Meyers, 2008). Ces différences dans l'AST des différents types de fibres sont dues aux différences liées à l'espèce, la ou les fonction(s) du muscle, et ça pourraient être due probablement aux techniques de mesure ou à un échantillonnage non représentatif des cellules musculaires étudiées.

Quant aux fibres du muscle ALD, au début de la croissance, la taille des fibres IIIB est presque identique à celle des fibres IIIA, mais à la fin de la croissance, les choses s'inversent et les IIIA sont les plus volumineuses que les IIIB. Cela pourrait être dû au fait qu'une partie des fibres IIIB est convertie pour devenir des fibres IIIA, tandis que le reste est converti en fibres IIA. L'analyse du test T de Student entre les fibres IIIA et IIIB n'a révélé aucune différence significative durant tous les âges étudiés. Nos résultats diffèrent des travaux de Harvey et Marshall (1998), qui ont indiqué que les fibres IIIB ont une taille moyenne par rapport aux fibres IIIA qui ont une taille large. Cependant, nos résultats sont en accord avec ceux de

Remignon et al. (1995), puisqu'ils n'ont pas trouvé de différences entre ces deux types de fibres durant tous les âges étudiés.

I.2.3 Calcul de Diamètre Moyen de Feret (DMF)

En général, le diamètre des fibres musculaires varie de 10 à 100 μm , mais il dépend de facteurs tels que la santé, l'espèce, la race, le sexe, l'âge et le plan de nutrition (Choi et Kim, 2009). Dubowitz et al. (2013) ont signalé dans leurs travaux que le diamètre moyen des fibres des muscles normaux d'un adulte humain varie entre 30 μm et 80 μm . Chen et al. (2007) ont trouvé que le diamètre des fibres musculaires chez des poulets à croissance lente ou rapide variait entre 6,63 μm et 66,49 μm . Dans notre travail, le DMF de l'ensemble des fibres des trois muscles de l'étude varie entre 4,66 μm et 51,23 μm .

Le DMF est beaucoup moins utilisé par la communauté des chercheurs en sciences musculaires, bien qu'il soit très résistant aux erreurs expérimentales telles que l'orientation de l'angle de section, selon Liu et al. (2013). Il est recommandé par Ruegg et Meinen (2014) ainsi que par Meng et al. (2014), qui ont encouragé les chercheurs à adopter cette technique. Cette mesure ne dépend que légèrement de l'orientation de la fibre et constitue généralement la norme de référence clinique en matière de mesure de la fibre, meilleure que l'AST. Cependant, elle est influencée par la technique de segmentation car elle mesure le plus petit diamètre dans la cellule musculaire (Meng et al., 2014).

Malgré cela, la plupart des chercheurs se sont principalement basés sur la mesure de l'AST des fibres musculaires (Remignon et al., 1994 ; Remignon et al., 1995 ; Berri et al., 2003 ; Berri et al., 2006), et peu d'études ont mesuré le DMF (Diamètre Moyen des Fibres) (Franco et al., 2012). Certains chercheurs ont mesuré le diamètre moyen des fibres, mais de manière différente du DMF, comme cité par Smith et Fletcher (1988), Edman et al. (1988), Frontera et al. (2010), Zalewska et al. (2014), Dragan Žikić et al. (2016). D'autres n'ont pas précisé comment ce paramètre était calculé (Papinah et al., 1996 ; Miraglia et al., 2006 avec un "système d'analyse d'image" ; Chen et al., 2007 avec un "système d'analyse d'image" ; Koomkrong et al., 2015 ; Huo et al., 2021 ; Huo et al., 2022).

Les moyennes du DMF des fibres musculaires du muscle Ps dans notre étude sont égales ou inférieures aux diamètres moyens du même muscle dans d'autres recherches, telles que celles de Huo et al. (2022) pour J0 « 4,66 μm – 6,6 μm », Chen et al. (2007) pour J0 « 4,66 μm – 8,4 μm », J14 « 19,4 μm – 24,19 μm », J28 « 27,51 μm – 32,01 μm », J42 « 36,99 μm – 40,69 μm » et J56 « 45,48 μm – 47,25 μm », Papinah et al. (1996) pour l'âge de J37 « 33,04 μm (J35)

– 59,7 μm », Kommkrong et al. (2015) pour l'âge de J45 « 36,99 μm (J42) – 52,31 μm », Smith et al. (1988) pour l'âge de J55 « 45,48 μm (J56) – 51 μm » sachant que la première valeur entre chaque 2 guillemets est le DMF de notre travail). Les différences pouvaient être expliquées par l'effet de race, les techniques utilisées pour mesurer ce diamètre et la nature du diamètre mesuré.

Le DMF des fibres IIIA du muscle ALD variaient entre 11,58 μm à J0 et 51, 23 μm à J56, alors que les fibres IIIB leurs DMF croit de 11,58 μm à J0 et 49,99 μm à l'âge d'abattage. Il n'y a pas de différence significative entre ces deux types de fibres en DMF dans le même âge durant tous les stades d'études et ça été bien constaté dans le travail de Remignon et al. (1995) sur deux souches sélectionnées de façon divergentes. Par contre Geyukoùlu et al. (2005) dans étude sur les muscles ALD chez la dinde ont trouvé que le diamètre moyen des fibres IIIB (45,4 \pm 5,1 μm) était significativement plus petit que celui des fibres IIIA (62,4 \pm 4,9 μm). Barnard et al., (1982) ont aussi constaté que les fibres de type III B sont généralement plus petites que la taille moyenne des fibres IIIA chez le poulet.

Nous n'avons pas trouvé de recherches ayant calculé le diamètre moyen des fibres des muscles Sart pour effectuer une comparaison. Quant au classement des différents types de fibres des muscles de l'étude selon leur DMF, il est presque similaire au classement de ces mêmes fibres selon leur AST (Surface Transversale des Fibres), à l'exception des fibres IIA du muscle ALD qui présentent la valeur de DMF la plus basse, malgré leur grande AST (ce point sera expliqué dans le coefficient de variabilité).

I.2.4 Coefficient de variabilité :

Dans un muscle normal, le coefficient de variabilité est inférieur à 250 et tout échantillon ayant un coefficient de variabilité supérieur à celui-ci est considéré comme démontrant une variabilité anormale de la taille des fibres (Dubowitz et al., 2013). Les différents types de myocytes des trois muscles de l'étude ont présenté un coefficient de variabilité inférieur à 250 - ce qui confirme l'aspect normal et sain de ces muscles - sauf les fibres IIA du muscle ALD et les fibres I du muscle Sart R.

Le coefficient de variabilité pour les fibres IIA du muscle ALD a présenté un chiffre très élevé qui est toujours supérieur à 1300 ce qui reflète une grande hétérogénéité dans le DMF des fibres IIA de ce muscle et ça pourrait être due au fait qu'une partie de ces fibres sont de type IIIB transformées en fibres IIA, sachant que les fibres IIIB sont plus grande que les IIA ce qui nous a donné cette grande hétérogénéité de DMF. Ça pourrait être aussi qu'une partie de ces fibres -

prétendu IIA qui ne sont pas réagies à la révélation de l'activité ATPasique (pH 4,6) - sont des fibres de type IIB alors que le reste sont des fibres IIA (Figure 17).

Une constatation similaire a été observée pour les fibres lentes de la partie rapide du muscle Sart, où le coefficient de variabilité est toujours supérieur à 250 jusqu'à l'âge de 49 jours. Cette variabilité pourrait être due au fait qu'une partie de ces fibres, initialement des fibres IIA (qui sont plus grandes), ont été transformées en fibres lentes de type I. Cette transformation a engendré une hétérogénéité dans la taille de ces fibres, responsable d'un coefficient de variabilité supérieur à 250.

I.3 Pourcentage de différents types de fibres dans les trois muscles :

Il est bien connu que la croissance musculaire postnatale est principalement réalisée par une augmentation de la taille des fibres musculaires et un changement du type de fibre musculaire vers le type glycolytique accompagné d'une diminution de la proportion des fibres oxydatives (Solomon et al., 1990 ; Karlsson et al., 1999 ; Chen et al., 2007).

I.3.1 Pectoral Superficiel (Ps)

Il convient de noter que, dans le poulet de chair, le muscle pectoral est composé uniquement de fibres musculaires de type IIB (Iwamoo et al., 2003; Roy et al., 2006). Les mêmes observations ont été notées sur les fibres musculaires du muscle Ps dans notre travail, qui sont presque exclusivement de type IIB. Les fragments de l'étude ont été récupérés à partir de la zone superficielle selon la technique décrite par Scheuerman et al. (2004).

Cependant, Smith et al. (1988) ont prouvé dans une étude sur trois zones (antérieure, intermédiaire et postérieure) chez des poulets de chair que la zone superficielle était composée à plus de 99 % de fibres blanches, le reste étant intermédiaire. La région la plus profonde, plus proche du sternum, contenait 54 % de fibres intermédiaires (IIA), près de 17 % de fibres blanches (IIB) et 29 % de fibres rouges (I).

I.3.2 Antérieur Latissimus Dorsi (ALD)

Par la suite, nous avons observé une diminution progressive des fibres IIB, de 25 % à 5 %, accompagnée d'une augmentation des fibres IIA, de 60 % à 85 %, avec l'apparition d'un petit pourcentage de fibres montrant une faible activité ATPasique à pH acide, probablement des IIA ou IIA+IIB, avec des pourcentages ne dépassant pas 5 % aux âges J35, J42, J49 et J56

respectivement. Cette augmentation des fibres IIIA et l'apparition des fibres oxydoglycolytiques de type II sont probablement dues à une conversion des fibres IIIB.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Gordon et al. (1977) qui ont montré, dans une recherche sur le muscle ALD du poulet, une diminution progressive du nombre de fibres à forte activité ATPasique (IIIB) et une augmentation concomitante des fibres à faible activité ATPasique (IIIA), sans mentionner les pourcentages de ces fibres. Ils sont également en accord avec les travaux de Toutant et al. (1980) qui ont confirmé que les proportions de fibres IIA variaient de 0,5 % à 5 %.

Alors que Geyukoùlu et al. (2005) ont cités brièvement dans leurs travaux sur le muscle ALD de la dinde abattus à 45J que le pourcentage de fibres IIIA variait de 70,50 % à 74,12 % et le pourcentage de fibres IIIB variait de 25,91 % à 29,71 %, mais ils confirmé qu'une conversion des fibres IIIB en fibres IIIA a été surveillée de manière ultra structurale et il n'était pas surprenant que des preuves histochimiques de conversion aient été observées.

Nos résultats diffèrent de ceux de Remignon et al. (1995) concernant une souche de poulet à croissance rapide en ce qui concerne le pourcentage des trois types de fibres. Ils ont observé une augmentation des fibres IIIA de 70,02 % (J7) à 77,04 % (J77), tandis que les fibres IIIB ont diminué de 29,98 % (J7) à 16,09 % (J77). Les fibres IIA ont été observées uniquement à J35 et J77, avec des pourcentages de 2,24 % et 6,87 % respectivement, probablement résultant d'une conversion des fibres IIIB. Barnard et al. (1982) ont mentionné, sans donner de détails, que les fibres de type IIIA étaient prédominantes dans les muscles ALD, plantaire et adducteur profond. Ces différences de pourcentages entre nos résultats et les recherches citées précédemment sont probablement dues à l'inter-variabilité régionale dans la distribution des fibres IIIB et IIA au sein du muscle ALD (nous expliquerons ce point dans la section suivante).

I.3.3 Sartorius Mixte (Sart M)

À J0, nous observons un pourcentage de fibres IIA+IIB avoisinant les 80 %, le reste étant représenté par les fibres lentes de type I. Nos résultats sont en accord avec ceux de Remignon et al. (1994) pour la souche de croissance rapide, qui ont trouvé un pourcentage de 84 % et 16 % respectivement pour ces types de fibres. Après observation, nous constatons une diminution progressive des fibres IIA de 65 % à J7 à 40 % à J56, accompagnée d'une augmentation des fibres IIB de 18 % à 40 %. Quant aux fibres lentes de type I, elles présentent une valeur fluctuante qui ne dépasse pas 20 %.

En comparant nos résultats avec la littérature, nous sommes en accord avec Tůmová et Teimouri (2009) qui montrent que la sélection pour le taux de croissance et le rendement de la viande chez le poulet a conduit à un accroissement des fibres musculaires de type IIB au détriment des fibres de type IIA. Cependant, nos résultats ne concordent pas avec ceux de Barnard et al. (1982) qui ont trouvé une prévalence de $IIA > IIB > I$ %. Remignon et al. (1994) ont confirmé une légère diminution de 49,47 % à J7 à 46,03 % à J77 pour les fibres IIA, et une légère augmentation de 37,21 % à 43,40 % pour les fibres IIB, tandis que les fibres lentes de type I représentaient moins de 16,67 %. Ces différences pourraient être attribuées à l'effet de la sélection génétique et/ou à des variations dans les techniques d'échantillonnage. En revanche, Cécile et al. (2003), dans leur étude sur l'effet de la pression de sélection sur les muscles du filet, ont observé une réduction relative de la surface occupée par les fibres glycolytiques blanches dans le muscle Sart de la cuisse, malgré un développement musculaire accru, ce qui contredit nos résultats puisque la sélection génétique tendrait à augmenter la proportion de fibres glycolytiques et non l'inverse.

I.3.4 Sartorius Rapide (Sart R)

Pour le muscle Sart R, nous avons enregistré 100 % de fibres rapides (IIA + IIB) au premier jour post-éclosion, en accord avec Remignon et al. (1994). Par la suite, nous avons observé une diminution des fibres oxydoglycolytiques (IIA) de 25 % à J7 à 15 % à J56, tandis que les fibres glycolytiques ont augmenté de 75 % à 85 %. Les fibres lentes de type I étaient initialement absentes au début de la croissance, pour ensuite être représentées de manière presque négligeable (< 5 %). En revanche, Remignon et al. (1994) ont observé une légère diminution de 39,27 % à J7 à 31,51 % à J77 pour les fibres IIA, et une légère augmentation de 60,72 % à 68,49 % pour les fibres IIB. Ces pourcentages ont continué à fluctuer jusqu'à atteindre 15 % et 85 % pour les fibres IIA et IIB respectivement à l'âge de 11 semaines. Barnard et al. (1982) ont trouvé des pourcentages de 90 % et 10 % pour les fibres IIB et IIA respectivement.

I.4 Répartition et distribution des différents types de fibres au sein des muscles et des faisceaux musculaires

I.4.1 Pectoral Superficiel (Ps)

Nous avons utilisé la technique de Schuremann et al. (2004) pour prélever et étudier le muscle Ps, ce qui nous a permis d'analyser uniquement la typologie des

fibres dans la partie la plus superficielle de ce muscle. Dans notre étude, la distribution des fibres glycolytiques de type IIB est homogène dans tous les faisceaux musculaires du Ps, avec une absence apparente des autres types de fibres. Cette observation est en accord avec la plupart des études précédentes sur ce muscle chez le poulet de chair. En revanche, ce muscle présente une variabilité typologique plus prononcée chez d'autres oiseaux comme les poulets à croissance lente (Edman et al., 1988) et les oiseaux migrateurs (Torella et al., 1998).

I.4.2 Antérieur Latissimus Dorsi (ALD)

A notre connaissance aucune étude n'a traité en détail et avec l'âge la distribution spatiale des différents types de fibres du muscle ALD chez le poulet de croissance rapide. La seule explication qu'on peut donner à la distribution homogène et l'augmentation avec l'âge des fibres IIIA de 60% à 85% accompagné en même temps par la diminution des fibres IIIB de 25% jusqu'à 5% surtout dans la moitié caudale par la conversion de ces dernières en fibres IIIA. Les fibres de type II qui sont apparues vers la fin de la période d'étude ne dépassent pas les 5 % et se retrouvent principalement dans la partie crâniale et médio-crâniale de ce muscle. Dans quelques rares cas, on les observe dispersées dans la partie centrale ou caudale du muscle.

Nos résultats corroborent généralement ceux de Toutant et al. (1980) qui ont signalé, dans une étude réalisée à deux âges différents sur le muscle ALD du poulet de chair, que la répartition des fibres β' (IIIB) n'était pas uniforme à travers le muscle. À la première semaine, elle variait entre 27 % dans la région postérieure et 52 % dans la région antérieure. Après un mois, la distribution des fibres α' (IIIA) et β' (IIIB) était inégale, avec une prédominance des fibres β' (IIIB) dans la partie antérieure du muscle. Ces auteurs ont suggéré que les fibres α' (IIIA) ne sont pas issues de néoformation mais se différencient probablement des fibres β' (IIIB) préexistantes. En revanche, Barnard et al. (1982) ont constaté que les fibres de type II aviaire se trouvent principalement dans les couches les plus externes du muscle ALD, sans préciser si cela concerne la partie latérale ou médiale du muscle. De plus, ils n'ont pas observé de telles fibres de type II dans la zone centrale du muscle.

I.4.3 Sartorius (Sart)

Nos résultats ont confirmé que le muscle Sartorius (Sart) n'est pas composé de deux parties distinctes, mixte et rapide, mais présente plutôt un gradient de distribution des fibres I et IIA qui diminuent progressivement de la partie médiale vers la partie latérale du muscle. En

revanche, les fibres IIB augmentent progressivement de la partie médiale vers la partie latérale. Cependant, la plupart des recherches antérieures considèrent ce muscle comme étant composé de deux parties distinctes, mixtes et rapides. Par exemple, Bernard et al. (1982), dans leurs études antérieures, ont prélevé des échantillons en se basant sur des jugements visuels à l'œil nu, choisissant des zones de surface rouge ou blanche opposée. Ils ont ensuite capturé des images sériées d'un nombre très limité de fibres à l'aide d'un microscope optique à partir de ces deux surfaces. Il est important de noter que l'apparence rouge ou blanche ne correspond pas nécessairement à une partie mixte ou rapide, car il existe une variabilité dans la transition des types de fibres avec l'âge, et l'apparence d'une fibre ne reflète pas toujours avec précision son type. Pour éviter cette source d'erreur, nous avons effectué des coupes complètes à travers toute la surface du muscle Sart jusqu'à l'âge de J28, puis nous avons coupé le muscle en deux lames distinctes : une pour la partie interne et une pour la partie externe, jusqu'à l'âge d'abattage. Toutes les lames ont été scannées pour créer des lames virtuelles, nous permettant de sélectionner les images sériées de manière précise et d'éviter ainsi les erreurs liées à la variabilité interrégionale, contrairement à l'utilisation du microscope optique.

Il est essentiel de considérer les travaux d'Ashmore et Doerr (1971), qui ont généralement signalé que le muscle Sartorius des oiseaux est connu pour être de composition mixte, présentant un gradient de fibres de type I du côté rouge du muscle à l'aspect blanc, comportant environ 90 % de fibres de type IIB et pratiquement aucune fibre de type I. De même, Remignon (1993) a observé une stabilité du pourcentage de fibres de type I, associée à une diminution du pourcentage de fibres de type IIA et à une augmentation du pourcentage de fibres de type IIB pour ce muscle. La distribution des fibres (I, IIA et IIB) dans le muscle Sart ressemble beaucoup à celle observée dans le muscle biceps et triceps brachial du rat, selon Fuentes et al. (1997). Ils ont observé que les fibres SO (type I) étaient localisées principalement dans les régions profondes, tandis que les fibres FG (type IIB) se trouvaient dans les régions intermédiaires et superficielles (les régions superficielles contenant les pourcentages les plus élevés de fibres FG). En revanche, chez le lapin, les fibres SO et FG sont réparties sur toute la longueur du muscle, bien que les fibres SO et FG soient plus abondantes dans les régions profondes et superficielles.

À notre connaissance, il n'existe pas de recherche dans la littérature traitant de la distribution des différents types de fibres musculaires au sein des faisceaux musculaires du muscle Sartorius chez le poulet de chair. Nous avons pu mettre en évidence que la distribution des fibres musculaires au sein des faisceaux suit généralement un schéma similaire à la

répartition globale précédemment décrite : les fibres lentes de type I (SO) se trouvent en profondeur des faisceaux, les fibres de type IIA (FOG) dans les zones intermédiaires, tandis que les fibres de type IIB (FG) sont situées à la périphérie des faisceaux. Nos résultats corroborent généralement ceux de Singh et al. (2001), qui ont constaté chez les singes (*Macaca mulatta*) que la distribution des fibres (SO, FOG et FG) dans les muscles individuels n'était pas uniforme, et qu'un gradient significatif était observé dans certains cas. Dans la majorité des muscles, la proportion de fibres SO avait tendance à augmenter dans les parties les plus profondes du muscle, tandis que les fibres FG étaient plus abondantes dans les parties les plus superficielles. Il est à noter que les muscles présentant la plus forte proportion de fibres lentes (comme le Coracobrachial, le Supraépineux et le Petit rond) étaient généralement de petite taille et situés en profondeur, souvent à proximité de l'os.

II. ÉTUDE COMPARATIVE ENTRE TROIS LOGICIELS DE TRAITEMENT D'IMAGE (2 SEMI-AUTOMATIQUES ET 1 AUTOMATIQUE)

L'étude de la biologie musculaire repose sur des critères physiologiques (de type métabolique ou contractile) et morphologiques (Nombre, AST, DMF et Périmètre). Les images traitées enregistrées à partir de coupes histologiques et histoenzimologiques de muscle sont les meilleures méthodes pour explorer ces déterminismes. Cette étude décrit les étapes du traitement de l'image musculaire, qui sont successivement, l'acquisition de l'image, la segmentation (détermination des morphométries) et la typologie des fibres (détermination du type contractile). L'analyse manuelle des différentes sections est laborieuse et chronophage, c'est pourquoi plusieurs auteurs ont développé des logiciels d'analyse d'images semi-automatique (Kammoun et al., 2014).

II.1 Acquisition d'image :

Il pourrait être approprié pour une bonne recherche sur les muscles de travailler avec un nombre supérieur à 400 fibres (Garton et al., 2010). Dans la présente étude, ce nombre est atteint en utilisant un grossissement x200 avec au moins 2 champs pour chaque type de coloration. Le nombre de champs augmente avec l'âge, ce dernier était respectivement, 2 à la post éclosion, J7 et J14, 3 champs à J21, 4 champs à J28, plus de 6 champs à J35, J42, J49, et J56, ce qui nécessite inévitablement plus de temps pour prendre les images sériées. Ce problème a obligé les chercheurs à minimiser le nombre de champs ainsi que le nombre de fibres à analyser (Singh et al., 2001 ; Kim et al., 2007 ; Liu et al., 2013) ; ou d'utiliser des grossissements différents dans une même étude avec des grossissements élevés pour les muscles du jeune âge et des grossissements faibles pour les muscles de l'adulte (Remignon, 1993). Ce dernier auteur a mené une étude sur les muscles de poulets en développement de J0 post éclosion jusqu'à l'âge de 55 semaines et a analysé en moyenne 400 fibres dans 2 champs microscopiques avec des grossissements différents (x45, x90 et x215). Cependant, la plupart des recherches n'ont pas précisé le grossissement utilisé et/ou le nombre de fibres analysées (Karen et al., 2009 ; Meng et al., 2014 ; Dale Zotte et al., 2015; Sapkota et al., 2015; Wang, 2016). Dans notre étude, le nombre moyen de fibres par image aux âges précoces, J0, J7 et J14 post éclosion est respectivement de 950, 227 et 253, ce qui est considéré comme acceptable.

Cependant, la segmentation de ces images était très difficile à cause de la petite taille des fibres et malgré la résolution acceptable de la caméra (18 MP). Les mêmes observations ont été produites en utilisant le grossissement x250. Les images de grossissement x100 sont plus adéquates en ce qui concerne le nombre moyen de fibres/image qui dépasse 400 fibres à J7, J14, J21 et J28, et 200 fibres à J35, J42, J49 et J56. Cependant, la segmentation était très difficile surtout aux âges précoces J7, J 14 et J21, où les images devenaient floues lorsque le zoom était appliqué pour reconnaître les limites des cellules. De plus, il est impossible de travailler sur des images avec ce grossissement à J0 post-éclosion.

Le grossissement x400 est plus laborieux du fait du nombre de champs qui dépasse 6 pour chaque muscle étudié à partir du jour 7 post-éclosion. Le nombre moyen de fibres/image à tous les âges étudiés varie entre 600 et 1000 en utilisant CytoF, ce qui est jugé très acceptable. Le logiciel utilisé par le groupe CytoF, peut travailler sur des images au format SVS, et il est sur cette détermination acceptable des fibres. De plus, la capacité de segmentation de ce dernier couvre toute la section virtuelle mais il est plus coûteux.

II.2 Temps nécessaire à la comparaison de segmentation entre les 3 logiciels (Cytoinformatics LLC « CytoF », Fiji « FDP, FM » et Image Pro Plus 10 « IP ») :

Les algorithmes d'analyse d'images sont largement utilisés par les chercheurs biomédicaux et les ingénieurs en logiciel. Pour mener à bien cette partie du travail, dans un premier temps, nous avons sélectionné 2 logiciels semi-automatiques qui sont ImageJ (Fiji) du NIH et IP, de Media Cybernetics puisque ces deux logiciels sont les plus populaires actuellement selon Kostrominova et al. (2013) et leur popularité dans les domaines de la recherche est associée à plusieurs facteurs tels que la précision des résultats, l'accessibilité (prix et disponibilité). Dans un second temps, nous avons travaillé avec le groupe Cytoinformatics LLC pour la segmentation avec un logiciel automatique. La comparaison entre les 3 logiciels a été réalisée sur la base de :

II.2.1 Temps nécessaire à la segmentation et le nombre de fibres obtenues :

L'observation du temps de segmentation des neuf images par les trois logiciels révèle que ce temps diminue avec l'âge, mais il varie d'une image à l'autre, ce qui pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs :

II.2.1.1 Degré d'automatisme de l'outil utilisé pour la segmentation

Le temps total nécessaire à la segmentation (en heures : minutes : secondes) des neuf images en FM est de 26 : 23 : 37 et leur temps moyen de segmentation est de 02 : 56 : 25. Ainsi, dans notre travail réalisé sur quatre muscles avec 10 répétitions pour neuf âges étudiés, il nous a fallu 1061,6 heures pour réaliser cette segmentation, ce qui équivaut à 44,33 jours de travail non-stop soit près de 353,23 jours avec 8 heures de travail par jour (Figure 34). De plus, la segmentation de ces images avec FDP a montré le temps le plus élevé (27 : 24 : 56) par rapport aux autres méthodes de segmentation ; par conséquent, le temps moyen pour chaque segmentation d'image est de 3 : 05 : 00, mais le FDP reste un outil précis pour mesurer les paramètres de la fibre musculaire.

Le temps total nécessaire à la segmentation de ces mêmes neuf images par IP est de 10:21:35 et leur temps moyen de segmentation est de 1:13:06 ; ainsi pour notre travail il a fallu 438,6 heures ce qui est équivalent à 18,27 jours de travail non-stop, soit près de 146,2 jours avec 8 heures de travail (Figure 34). D'autre part, les nouveaux algorithmes de traitement d'image peuvent gérer une segmentation automatique de l'image en moins d'une minute (Liu et al., 2013 ; Cui et al.,2019) même si ces images ont une grande échelle pouvant atteindre jusqu'à 9000x9000 (Cui et al.,2019) ce qui réduit considérablement le temps moyen de traitement des images.

II.2.1.2 Nombre de fibres/image :

Qui est lié à plusieurs facteurs tels que :

Age : Le nombre de fibres/image diminue progressivement avec l'âge du fait de la croissance radiale de la fibre et donc le temps de segmentation est corrélé négativement avec l'âge.

Forme et taille de la fibre : la forme irrégulière et imbriquée ainsi que la petite taille de la fibre augmentent le temps de segmentation ; ces mêmes résultats sont observés par Liu et al. (2013) ; Wang (2016).

Pourcentage de tissu conjonctif :

Lorsque le tissu conjonctif est abondant dans l'image, le nombre de fibres sera moindre d'un côté, et de l'autre, le nombre de fibres étroitement apposées diminue, ce qui réduit le temps de segmentation. Le pourcentage de tissu conjonctif varie au sein du même muscle et d'un

muscle à l'autre ; il a une valeur décroissante allant du muscle lent → muscle intermédiaire → muscle rapide, selon nos travaux inédits. À titre d'exemple, les images choisies aux âges J21 et J28, qui contenaient beaucoup de tissu conjonctif et dont le nombre de fibres ne dépassait pas 420, présentaient un temps de segmentation inférieur à celui des autres images (Figure 34 et Tableau 15).

Qualité de l'image : l'image bien colorée avec une bonne résolution et moins de débris et d'artefacts à un temps de segmentation faible.

II.2.2 Temps nécessaire au post-traitement des images segmentées :

La performance d'un logiciel de traitement d'images pour les tissus musculaires est liée à sa capacité à éliminer les artefacts, les tissus non pertinents et à séparer tout contact entre les fibres. Le temps moyen (en heure : minute : seconde) du post traitement des neuf images segmentées par FDP et FM était d'environ 00 : 25 : 00 (Figure 35) et donc un temps total pour le post traitement de toutes les images de notre travail qui tourne autour de 112 :50 :00.

Le temps moyen de post traitement des neuf images segmentées par CytoF qui a été réalisé par Fiji est de 0 :10 :16h (Figure 35) et donc un temps total moyen pour le post-traitement de toutes les images de notre travail qui est estimé à 45 : 72 : 00h. Le temps de post-traitement des images segmentées par CytoF est très faible car ces images ne contiennent pas d'artefacts et de tissus non pertinents et ce temps n'est destiné qu'à la segmentation des fibres en contact.

De plus, le temps moyen du post-traitement de ces mêmes images par Image IP est le plus élevé par rapport au logiciel précédent avec un temps de 00 : 32 : 06 h (Figure 35). Par conséquent, un temps total qui est moyen de 144 : 45 : 00 h, cela est dû à la présence de nombreux artefacts et de tissus non pertinents dans les images segmentées avec ce logiciel (Figure 41).

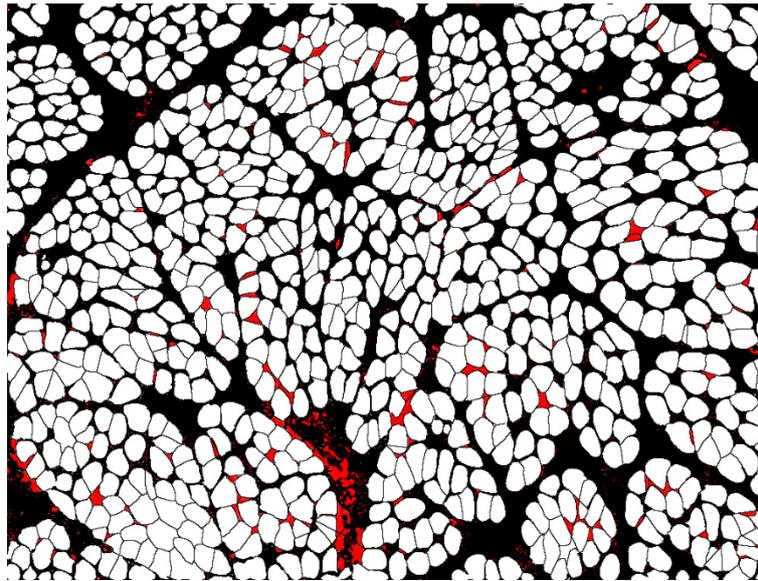


Figure 41: Image du muscle ALD d'un poulet âgé de 42 jours segmentée par IP montrant les artefacts et les tissus non pertinents en rouge.

II.3 Comparaison des paramètres des fibres musculaires obtenus après segmentation avec les trois logiciels :

Les 3 méthodes de segmentation FDP, FM et CytoF ont donné des résultats cohérents pour l'AST, mais avec des différences non significatives, cette différence est inférieure à 3,34 % pour CytoF par rapport à FDP (Tableau 103). Ce paramètre (AST) qui est le critère principal d'étude de la fibre musculaire confirme que les mesures obtenues par CytoF sont plus proches des mesures obtenues par la segmentation manuelle réalisée par FDP et FM. Pas de différence significative entre FDP et FM. Cependant, statistiquement, il existe des différences très significatives pour le Périmètre et le DMF entre CytoF et FDP mais les différences ne sont pas aberrantes (Tableau 103) avec des pourcentages assez encourageants pour ces deux paramètres calculés par le CytoF (moins de 5,06% et 5,01% pour le Périmètre et DMF respectivement) par rapport à celles calculées par FDP.

Selon Kostrominova et al. (2013), Image J (Fiji) et IP sont largement acceptés pour des mesures précises de l'AST. La différence très significative entre FDP et IP concernant la surface moyenne de la fibre est liée à l'étape de seuillage d'IP, qui ne compte pas une petite marge de la surface de certaines fibres musculaires (Figure 42), ce qui influe sur le calcul de la valeur moyenne de l'AST. Cette dernière est néanmoins inférieure de 5,02 % par rapport à celle calculée par FDP, mais elle reste très satisfaisante.

Les différences très significatives entre FDP et IP concernant le périmètre et le DMF sont liées au calcul de la surface de la fibre (moins de surface = moins de périmètre et moins de DMF). Le DMF est très résistant aux erreurs expérimentales telles que l'orientation de l'angle de section (Liu et al., 2013), et il est recommandé par Ruegg et Meinen (2014). Cependant, il est influencé par la technique de segmentation car il mesure le petit diamètre dans la cellule musculaire (Meng et al., 2014). Malgré cela, les valeurs moyennes calculées par IP de ces deux paramètres (Périmètre et DMF) sont également acceptables ; ils sont respectivement inférieurs à 7,19% et 3,96% par rapport à ceux trouvés par FDP. Les outils semi-automatiques (Fiji et IP), nécessitent toujours un traitement préalable, où l'opérateur doit interagir manuellement avec l'ordinateur, à l'aide d'un stylo numériseur ou d'une souris d'ordinateur, pour éliminer les artefacts et les tissus non pertinents et tracer les contours des fibres musculaires non segmentées.

Cette interaction rend l'analyse d'un grand nombre d'images plus laborieuse et peu pratique, ces observations sont confirmées par certains auteurs (Mayachitra, 2006 ; Janssens et al., 2013 ; Cui et al., 2019) ; malgré cela, le logiciel Fiji reste utilisé par une large communauté de chercheurs. En ce qui concerne les outils automatiques et malgré leurs services payants et leur disponibilité limitée (en plus des critiques adressées à un certain nombre de ces programmes, comme l'utilisation de raccourcis en supposant, par exemple, que les fibres sont des cercles ou des ellipses), les mesures des paramètres morphologiques des fibres peuvent être inexactes (Meng et al., 2014). Cependant, le logiciel CytoF reste exempt de ces critiques et donne des résultats satisfaisants.

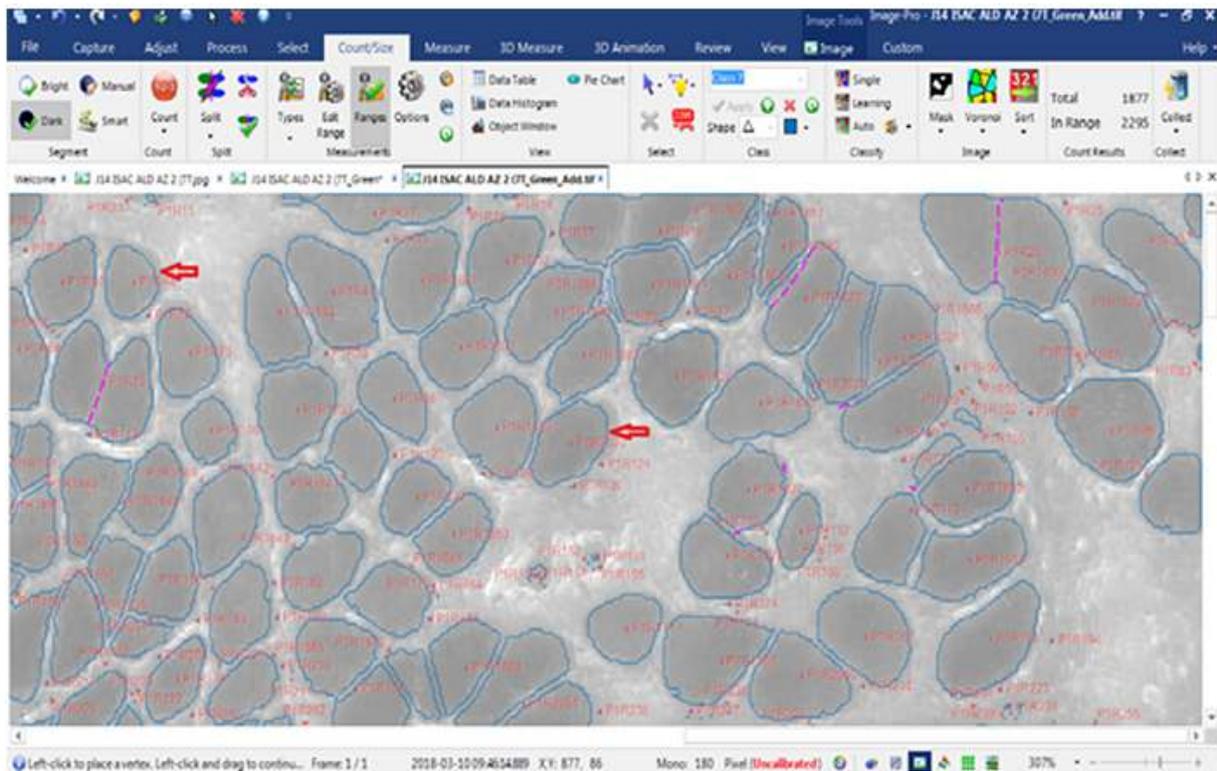


Figure 41: Image segmentée par IP, les flèches rouges indiquent les petites marges faisant partie des fibres et qui sont négligées lors de la segmentation par le logiciel.

II.4 Typologie des fibres :

Nous avons adopté la méthode manuelle de typage des fibres musculaires pour deux raisons : la première est le surcoût et la seconde est la difficulté de classer toutes les cellules musculaires, surtout lorsque les sections ou les fibres musculaires ne sont pas parallèles entre elles, changent de forme à travers une grande série de sections, disparaissent ou se séparent de la section. Ces difficultés sont bien présentées dans notre travail et prouvées par Karen et al. (2009).

CONCLUSION

Notre travail, réalisé en profitant des nouvelles technologies de traitement d'image, nous a permis de ressortir les constatations et les perspectives suivantes :

* Étude des paramètres morphométriques, histologiques et histochimiques des fibres musculaires :

- Le nombre de fibres musculaires est diminué progressivement avec l'âge.
- Le muscle Sart n'est pas composé de deux parties mixte et rapide, mais réellement il a une variabilité de distribution intra musculaire des fibres (les fibres lentes I et IIA diminuent de la partie médiale à la partie latérale, tandis que les fibres IIB augmentent de la partie médiale vers la partie latérale).

Le muscle ALD a également présenté une variabilité de distribution intramusculaire. Les fibres IIIA sont bien dispersées sur toute la surface du muscle, alors que les fibres IIIB étaient bien dispersées sur toute la surface du muscle pour diminuer progressivement dans la partie caudale. Les fibres IIA sont rares au début de la croissance, mais apparaissent plus tard, surtout dans les parties crâniale, médio-crâniale et caudale du muscle.

* Traitement d'image du tissu musculaire :

- Sur les lames scannées, on peut sélectionner des images avec une grande échelle, une bonne résolution et un nombre très satisfaisant de cellules musculaires par image par rapport aux images capturées avec les différents grossissements les plus couramment utilisés par la communauté des chercheurs. Ainsi, pour des travaux fiables dans le domaine du tissu musculaire, ce type d'images remplacera progressivement les images du microscope.
- Chaque progrès dans l'automatisation de l'acquisition de l'image et de son traitement est un atout supplémentaire pour les chercheurs du muscle, permettant de réduire considérablement le temps nécessaire au traitement d'une image, passant de plusieurs heures à quelques minutes ou même secondes. Ce temps gagné peut être consacré à d'autres étapes de leurs travaux de recherche.
- Les services fournis par le groupe Cytoinformatics dans le domaine de la segmentation des cellules musculaires sont très satisfaisants et plus précis. Cependant, un petit souci persiste : la segmentation est réalisée par les membres du groupe et non par le chercheur lui-même, obligeant ce dernier à effectuer une

étape de post-traitement des images pour enlever les éventuels contacts entre cellules à l'aide d'un autre outil.

- L'avantage de Fiji est son accès libre, ce qui en fait un sanctuaire pour les chercheurs et les petits laboratoires ayant des ressources limitées. Cependant, bien que ce logiciel soit universel, sa structure de menu est riche en fonctionnalités avec une interface graphique complexe qui nécessite une bonne formation. Il serait préférable de développer une version spéciale de Fiji pour le traitement des images musculaires, en supprimant les fonctionnalités inutiles et en simplifiant l'interface pour la rendre plus conviviale, tout en fournissant une documentation complète pour faciliter leur traitement.
- Image Pro Plus 10 est plus simple, convivial et rapide pour le traitement des images du tissu musculaire par rapport à Fiji, mais il nécessite une bonne maîtrise de ses outils pour obtenir des résultats très satisfaisants.
- Les études histologiques limitées à l'observation d'un champ restreint de fibres ou à l'étude de petits fragments musculaires isolés à partir de biopsies ou de coupes partielles ne reflètent pas fidèlement l'aspect histologique réel du muscle, en raison des variations inter/intra musculaires présentes entre l'ensemble des muscles d'un être vivant. Ainsi, des études histo-enzymologiques approfondies couvrant l'ensemble des surfaces des muscles seraient indispensables pour évaluer l'état d'un muscle ou pour étudier sa corrélation avec la qualité de la viande.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aberle, E. D., & Stewart, T. S. (1983). Growth of fiber types and apparent fiber number in skeletal muscle of broiler-and layer-type chickens. *Growth*, 47(2), 135-144.
- Achouri, A. (2008). La musculature du poulet de chair (Étude de la morphométrie et de la composition chimique des muscles pectoraux et de certains muscles de la cuisse). Mémoire de magister, université de Batna.
- Achouri, A., Melizi, M., Belbedj, H., & Azizi, A. (2021). Comparative study of histological and histo-chemical image processing in muscle fiber sections of broiler chicken. *Journal of Applied Poultry Research*, 30(3), 100173.
- Acosta, L., & Roy, R. R. (1987). Fiber-type composition of selected hindlimb muscles of a primate (cynomolgus monkey). *The Anatomical Record*, 218(2), 136-141.
- Ameisen, D., Le Naour, G., & Daniel, C. (2012). Technologie des lames virtuelles-De la numérisation à la mise en ligne. *médecine/sciences*, 28(11), 977-982.
- Baeza, E., & Brillard, J. P. (2004). Effet d'une réversion du sexe sur le développement musculaire du poulet. *10 èmes Journées «Sciences du Muscle et Technologies des Viandes»*, 49.
- Barnard, E. A., Lyles, J. M., & Pizzey, J. A. (1982). Fibre types in chicken skeletal muscles and their changes in muscular dystrophy. *The Journal of Physiology*, 331(1), 333-354.
- Barone, R. (2000). Anatomie comparée des mammifères domestiques Tome 2-Arthologie et myologie-(4eéd.). *Association centrale d'entraide vétérinaire*.
- Baumel, J. J., King, A. S., Breazile, J. E., Evans, H. E., & Vanden Berge, J. C. (1993). Nomina anatomica avium published by the Nuttall Ornithological Club.
- Bee, G., Calderini, M., Biolley, C., Guex, G., Herzog, W. (2006). Changes of the histochemical properties and meat quality traits of porcine muscles during growth. II. Effect of feed restriction in pigs slaughtered at the same body weight and varying age. *Arch. Tierzucht* 49:62-66.
- Bérard, J., Kalbe, C., Lösel, D., Tuchscherer, A., & Rehfeldt, C. (2011). Potential sources of early-postnatal increase in myofibre number in pig skeletal muscle. *Histochemistry and cell biology*, 136, 217-225.
- Berri, C., & Duclos, M. J. M. (2003). Typologie et ontogenèse des fibres musculaires chez les oiseaux. *Productions animales*, 16(2), 137-143.
- Berri, C., Guernec, A., Le Bihan-Duval, E., & Duclos, M. J. M. (2003). Modalité de la croissance musculaire chez le poulet en relation avec le génotype. In *5èmes Journées de la Recherche Avicole*.

- Berri, C., Le Bihan-Duval, E., Debut, M., Sante-Lhoutellier, V., Haj Hattab, N., & Jehl, N. (2006). Hypertrophie des fibres musculaires: Conséquence pour la qualité technologique du filet de poulet. *Viandes et produits carnés (Aubière)*, 25(3), 95-98.
- Bigot, K., Tesseraud, S., Taouis, M., & Picard, M. (2001). Alimentation néonatale et développement précoce du poulet de chair. *Productions animales*, 14(4), 219-230.
- Boggs, D. F., & Dial, K. P. (1993). Neuromuscular organization and regional EMG activity of the pectoralis in the pigeon. *Journal of morphology*, 218(1), 43-57.
- Bottinelli, R. Y. C. R., & Reggiani, C. (2000). Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Progress in biophysics and molecular biology*, 73(2-4), 195-262.
- Brandstetter, A. M., Picard, B., & Geay, Y. (1997). Regional variations of muscle fibre characteristics in m. semitendinosus of growing cattle. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 18(1), 57-62.
- Brooke, M. H., & Kaiser, K. K. (1970). Muscle fiber types: how many and what kind?. *Archives of neurology*, 23(4), 369-379.
- Bruce S, Phillips S & Woledge R (1997). Interpreting the relation between force and cross-sectional area in human muscle. *Med Sci Sports Exerc* 29, 677-683.
- Buche, P., & Mauron, D. (1997). Quantitative characterization of muscle fiber by image analysis. *Computers and electronics in agriculture*, 16(3), 189-217.
- Bünger, L., Navajas, E. A., Stevenson, L., Lambe, N. R., Maltin, C. A., Simm, G., ... & Chang, K. C. (2009). Muscle fibre characteristics of two contrasting sheep breeds: Scottish Blackface and Texel. *Meat science*, 81(2), 372-381.
- Burke, W. H., & Henry, M. H. (1997). Characteristics of the pectoralis superficialis and semimembranosus of broiler strain chickens, bantam chickens, and the reciprocal crosses. *Poultry Science*, 76(5), 767-773.
- Burkholder, T. J., Fingado, B., Baron, S., & Lieber, R. L. (1994). Relationship between muscle fiber types and sizes and muscle architectural properties in the mouse hindlimb. *Journal of morphology*, 221(2), 177-190.
- Bye, E., Grønnerød, O., & Vogt, N. B. (1989). Multivariate classification of histochemically stained human skeletal muscle fibres by the SIMCA method. *The Histochemical Journal*, 21, 15-22.
- Carlson, B. M. (2019). The Muscular System. *The Human Body*, 111-136.
- Chatelain, E., (1986). Anatomie des volailles. Laboratoire d'anatomie, ENVL, France.
- Ceglia, L., Niramitmahapanya, S., Price, L. L., Harris, S. S., Fielding, R. A., & Dawson-Hughes, B. (2013). An evaluation of the reliability of muscle fiber cross-sectional area and fiber number measurements in rat skeletal muscle. *Biological procedures online*, 15, 1-6.

- Chen, X. D., Ma, Q. G., Tang, M. Y., & Ji, C. (2007). Development of breast muscle and meat quality in Arbor Acres broilers, Jingxing 100 crossbred chickens and Beijing fatty chickens. *Meat Science*, 77(2), 220-227.
- Chiang, W., Solomon, M. B., & Kotula, K. L. (1995). Muscle fiber types of selected muscles from broiler chickens in relation to age and sex 1. *Journal of Muscle Foods*, 6(3), 197-210.
- Choi, Y. M., and Kim, B. C. (2009). Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livestock Science*, 122(2-3), 105-118.
- Choi, Y. M., Nam, K. W., Choe, J. H., Ryu, Y. C., Wick, M. P., Lee, K., & Kim, B. C. (2013). Growth, carcass, fiber type, and meat quality characteristics in Large White pigs with different live weights. *Livestock Science*, 155(1), 123-129.
- Cotrel, C. (2004). Analyse de la typologie musculaire du cheval trotteur français.
- Cui, L., Feng, J., & Yang, L. (2019). Towards fine whole-slide skeletal muscle image segmentation through deep hierarchically connected networks. *Journal of Healthcare Engineering*, 2019.
- Dalle Zotte, A., Metzger, S. Z., Remignon, H., & Szendro, Z. S. (2015). Etude morphométrique et histochimique des fibres musculaires des lapereaux issus de mères nourries avec un aliment supplémenté en lysine. *Proceedings: 11èmes J. Rech. Cunicoles Fr, Paris (INRA ed.), ITAVI publ., Paris*, 151-154.
- Desgeorges, T., Liot, S., Lyon, S., Bouvière, J., Kemmel, A., Trignol, A., ... & Juban, G. (2019). Open-CSAM, a new tool for semi-automated analysis of myofiber cross-sectional area in regenerating adult skeletal muscle. *Skeletal muscle*, 9, 1-12.
- Dial, K. P., Kaplan, S. R., Goslow Jr, G. E., & Jenkins Jr, F. A. (1988). A Functional Analysis Of The Primary Upstroke And Downstroke Muscles In The Domestic Pigeon (Columba Lima) During Flight. *Journal of Experimental Biology*, 134(1), 1-16.
- Dial, K.P., (1992). Activity patterns of the wing muscle of the pigeon (Columba livia) during different modes of flight. *J Exp Zool*, 262:357-373
- Donley, S. (2011). Characterization of Increased Muscle Growth in a Heavy Weight Line of Japanese Quail (Doctoral dissertation, The Ohio State University).
- Dransfield, E., & Sosnicki, A. A. (1999). Relationship between muscle growth and poultry meat quality. *Poultry science*, 78(5), 743-746.
- Dryden, I. L., Farnoosh, R., & Taylor, C. C. (2006). Image segmentation using Voronoi polygons and MCMC, with application to muscle fibre images. *Journal of Applied Statistics*, 33(6), 609-622.
- Dubowitz, V., Sewry, C. A., & Oldfors, A. (2013). Muscle biopsy: a practical approach: expert consult. *Online and Print*.
- Duchamp, C., Cohen-Adad, F., Rouanet, J. L., & Barré, H. (1992). Histochemical arguments for muscular non-shivering thermogenesis in muscovy ducklings. *The Journal of physiology*, 457(1), 27-45.

- Duclos, M. J., Berri, C., & Le Bihan-Duval, E. (2007). Muscle growth and meat quality. *Journal of Applied Poultry Research*, 16(1), 107-112.
- Edman, A. C., Lexell, J., Sjöström, M., & Squire, J. M. (1988). Structural diversity in muscle fibres of chicken breast. *Cell and tissue research*, 251, 281-289.
- Engel, W. K., (1962). The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. *Neurology*, 12: 778–784.
- English, A. W., & Letbetter, W. D. (1982). Anatomy and innervation patterns of cat lateral gastrocnemius and plantaris muscles. *American Journal of Anatomy*, 164(1), 67-77.
- Eržen, I., and Maravić, V. (1993). Simultaneous histochemical demonstration of capillaries and muscle fibre types. *Histochemistry*, 99(1), 57-60.
- Fowler, S. P., Champion, D. R., Marks, H. L., & Reagan, J. O. (1980). An analysis of skeletal muscle response to selection for rapid growth in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Growth*, 44(3), 235-252.
- Franco, J. R. G., Murakami, A. E., do Amaral Duarte, C. R., Fernandes, J. I. M., de Moraes Garcia, E. R., & Moreira, I. (2012). Delayed placement and dietary lysine levels, on diets based in the ideal protein concept, on muscular development and carcass yield of broiler chickens. *Ciência Rural*, 42(9), 1655-1662.
- Frontera, W. R., DeLisa, J. A., Gans, B. M., Walsh, N. E., Robinson, L. R., & Basford, J. (2010). *Physical medicine and rehabilitation: principles and practice*. Lippincott Williams & Wilkins Health.
- Fuentes, I., Cobos, A. R., & Segade, L. A. G. (1998). Muscle fibre types and their distribution in the biceps and triceps brachii of the rat and rabbit. *The Journal of Anatomy*, 192(2), 203-210.
- Garton, F., Seto, J. T., North, K. N., & Yang, N. (2010). Validation of an automated computational method for skeletal muscle fibre morphometry analysis. *Neuromuscular Disorders*, 20(8), 540-547.
- GEYİKOĞLU, F., Vuraler, Ö., & TEMELLİ, A. (2005). The histochemical and ultrastructural structures of avian latissimus dorsi muscle fiber types and changes in them caused by water copper level. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 29(1), 131-138.
- Giddings, C. J., & Gonyea, W. J. (1992). Morphological observations supporting muscle fiber hyperplasia following weight-lifting exercise in cats. *The Anatomical Record*, 233(2), 178-195.
- Goldspink, G. (1999). Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *Journal of anatomy*, 194(3), 323-334.
- Goldspink, G., & Yang, S. Y. (1999). Muscle structure, development and growth. In *Poultry meat science, Poultry science symposium series*. Oxon: CAB International (pp. 3-18).

- Gollnick, P. D., Parsons, D. O. R. A. B. E. T. H., Riedy, M. A. R. K., & Moore, R. L. (1983). Fiber number and size in overloaded chicken anterior latissimus dorsi muscle. *Journal of Applied Physiology*, 54(5), 1292-1297.
- Gonyea, W. J., Marushia, S. A., & Dixon, J. A. (1981). Morphological organization and contractile properties of the wrist flexor muscles in the cat. *The Anatomical Record*, 199(3), 321-339.
- Gordon, T., Perry, R., Srihari, T & Vrbovfi, G. (1977). Differentiation of Slow and Fast Muscles in Chickens. *Cell Tiss. Res.* 180, 211-222 (1977)
- Grimby, G., & Saltin, B. (1983). The ageing muscle. *Clinical physiology*, 3(3), 209-218.
- Grove, B. K., Cerny, L., Perriard, J. C., Eppenberger, H. M., Thornell, L. E. (1989) Fiber Type-specific Distribution of M-band Proteins in Chicken Muscle. *J Histochem Cytochem*, 37(4), 447-54.
- Harvey, A. L., & Marshall, I. G. (1998). Skeletal Muscle. *Sturkie's Avian Physiology, Fifth Edition*. 123-139
- Henckel, P. (1989). A rapid method to determine histochemical properties of skeletal muscles including fibre types. In *Proceedings of the 40th annual meeting for animal production, Dublin, Ireland* (p. 9).
- Henckel, P., Oksbjerg, N., Erlandsen, E., Barton-Gade, P., & Bejerholm, C. (1997). Histo- and biochemical characteristics of the longissimus dorsi muscle in pigs and their relationships to performance and meat quality. *Meat Science*, 47(3-4), 311-321.
- Henriksson-Larsén, K. (1985). Distribution, number and size of different types of fibres in whole cross-sections of female m tibialis anterior. An enzyme histochemical study. *Acta physiologica scandinavica*, 123(3), 229-235.
- Herbison, G.J., Jawed, M.M., Dituno, J.F., (1982). Muscle fiber types, symposium report. *Archives of physics and medecine*, 63, 227-230.
- Horak, V., (1989). Successive histochemical staining for succinate dehydrogenase and reserved ATPase in a single section for the *skeletal* muscle fibre typing. *histochemistry*, 10, 545-553
- Hosdez, J. (2017). Fissuration par fatigue de fontes à graphite sphéroïdal et vermiculaire: caractérisation des effets de la plasticité et d'un vieillissement thermique (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat, Centrale Lille, p 35).
- Hunt, M. C., & Hedrick, H. B. (1977). Profile of fiber types and related properties of five bovine muscles. *Journal of Food Science*, 42(2), 513-517.
- Huo, W., Weng, K., Gu, T., Zhang, Y., Zhang, Y., Chen, G., & Xu, Q. (2021). Effect of muscle fiber characteristics on meat quality in fast-and slow-growing ducks. *Poultry science*, 100(8), 101264.
- Huo, W., Weng, K., Li, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Xu, Q., & Chen, G. (2022). Comparison of muscle fiber characteristics and glycolytic potential between slow-and fast-growing broilers. *Poultry science*, 101(3), 101649.

- Ihemelandu, E. C. (1980). Decrease in fibre numbers of dog pectineus muscle with age. *Journal of anatomy*, 130(Pt 1), 69.
- Janssens, T., Antanas, L., Derde, S., Vanhorebeek, I., Van den Berghe, G., & Grandas, F. G. (2013). CHARISMA: An integrated approach to automatic H&E-stained skeletal muscle cell segmentation using supervised learning and novel robust clump splitting. *Medical image analysis*, 17(8), 1206-1219.
- Jaturasitha, S., 2004. Meat management. Mingmuang Press, Chiang Mai, Thailand.
- Jaturasitha, S., Srikanchai, T., Kreuzer, M., & Wicke, M. (2008). Differences in carcass and meat characteristics between chicken indigenous to northern Thailand (Black-boned and Thai native) and imported extensive breeds (Bresse and Rhode Island Red). *Poultry science*, 87(1), 160-169.
- Joandel Monier, S. (1997). *Influence du polymorphisme musculaire sur les propriétés gelifiantes des protéines myofibrillaires* (Doctoral dissertation, Clermont-Ferrand 2).
- Joubert Y., Tobin, C., Lebart, M.C., and Chang, C. (1994). Ultrastructural localisation of androgen receptor in levator ani muscle in the rat. *abstract 13 ICEM Paris*, 17-22, 1994.
- Joubert, Y., & Tobin, C. (1995). Testosterone treatment results in quiescent satellite cells being activated and recruited into cell cycle in rat levator ani muscle. *Developmental biology*, 169(1), 286-294.
- Kammoun, M., Cassar-Malek, I., Meunier, B., & Picard, B. (2014). A simplified immunohistochemical classification of skeletal muscle fibres in mouse. *European journal of histochemistry: EJH*, 58(2).
- Karen, P., Števanec, M., Smerdu, V., Cvetko, E., Kubínová, L., & Eržen, I. (2009). Software for muscle fibre type classification and analysis. *European journal of histochemistry: EJH*, 53(2).
- Karlsson, A. H., Klont, R. E., & Fernandez, X. (1999). Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livestock Production Science*, 60(2-3), 255-269.
- Kernell, D. (1998). Muscle regionalization. *Canadian journal of applied physiology*, 23(1), 1-22.
- Kim, G. D., Kim, B. W., Jeong, J. Y., Hur, S. J., Cho, I. C., Lim, H. T., & Joo, S. T. (2013). Relationship of carcass weight to muscle fiber characteristics and pork quality of crossbred (Korean native black pig × Landrace) F₂ pigs. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 522-529.
- Kim, J. M., Lee, Y. J., Choi, Y. M., Kim, B. C., Yoo, B. H., & Hong, K. C. (2008). Possible muscle fiber characteristics in the selection for improvement in porcine lean meat production and quality. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(10), 1529-1534.
- Kim, Y. J., Brox, T., Feiden, W., & Weickert, J. (2007). Fully automated segmentation and morphometrical analysis of muscle fiber images. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 71(1), 8-15.

- Kirchofer, K. S., Calkins, C. R., & Gwartney, B. L. (2002). Fiber-type composition of muscles of the beef chuck and round. *Journal of animal science*, 80(11), 2872-2878.
- Klein, C. S., Marsh, G. D., Petrella, R. J., & Rice, C. L. (2003). Muscle fiber number in the biceps brachii muscle of young and old men. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 28(1), 62-68.
- Klemenčič, A., Kovačič, S., & Pernuš, F. (1998). Automated segmentation of muscle fiber images using active contour models. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 32(4), 317-326.
- Klont, R. E., Brocks, L., & Eikelenboom, G. (1998). Muscle fibre type and meat quality. *Meat science*, 49, S219-S229.
- Koomkron, N., Theerawatanasirikul, S., Boonkaewwan, C., Jaturasitha, S., & Kayan, A. (2015). Breed-related number and size of muscle fibres and their response to carcass quality in chickens. *Italian Journal of Animal Science*, 14(4), 4145.
- Kostrominova, T. Y., Reiner, D. S., Haas, R. H., Ingermanson, R., & McDonough, P. M. (2013). Automated methods for the analysis of skeletal muscle fiber size and metabolic type. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 306, 275-332.
- Krivickas, L. S., Dorer, D. J., Ochala, J., & Frontera, W. R. (2011). Relationship between force and size in human single muscle fibres. *Experimental physiology*, 96(5), 539-547.
- Lawlor, M. W., Read, B. P., Edelstein, R., Yang, N., Pierson, C. R., Stein, M. J., ... & Beggs, A. H. (2011). Inhibition of activin receptor type IIB increases strength and lifespan in myotubularin-deficient mice. *The American journal of pathology*, 178(2), 784-793.
- Lee, S. H., Kim, J. M., Ryu, Y. C., & Ko, K. S. (2016). Effects of morphological characteristics of muscle fibers on porcine growth performance and pork quality. *Korean journal for food science of animal resources*, 36(5), 583.
- Li, Y., Yuan, L., Yang, X., Ni, Y., Xia, D., Barth, S., ... & Zhao, R. Q. (2007). Effect of early feed restriction on myofibre types and expression of growth-related genes in the gastrocnemius muscle of crossbred broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, 98(2), 310-319.
- Lefaucheur, L., Edom, F., Ecolan, P., & Butler-Browne, G. S. (1995). Pattern of muscle fiber type formation in the pig. *Developmental Dynamics*, 203(1), 27-41.
- Listrat, A., Lebret, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., & Bugeon, J. (2015). Comment la structure et la composition du muscle déterminent la qualité des viandes ou chairs?. *INRA Productions Animales*, 28(2), 125-136.
- Liu, F., Mackey, A. L., Srikuea, R., Esser, K. A., & Yang, L. (2013). Automated image segmentation of haematoxylin and eosin stained skeletal muscle cross-sections. *Journal of microscopy*, 252(3), 275-285.
- Lowenthal, D. T., Kendrick, Z. V., Starnes, J. W., & Carmeli, E. (2006). Effects of caloric restriction and exercise training on skeletal muscle histochemistry in aging Fischer 344 rats. *TheScientificWorldJOURNAL*, 6, 1339-1349.

- MacDougall, J. D., Sale, D. G., Alway, S. E., & Sutton, J. R. (1984). Muscle fiber number in biceps brachii in bodybuilders and control subjects. *Journal of Applied Physiology*, 57(5), 1399-1403.
- Mahon, M. (1999). Muscle abnormalities: morphological aspects. In 'Poultry meat science: poultry science symposium. Series 25,.(Eds RI Richardson, GC Mead) pp. 19-64.
- Malisoux, L., Jamart, C., Delplace, K., Nielens, H., Francaux, M., & Theisen, D. (2007). Effect of long-term muscle paralysis on human single fiber mechanics. *Journal of applied physiology*, 102(1), 340-349.
- Matoba, H., Allen, J. R., Bayly, W. M., Oakley, C. R., & Gollnick, P. D. (1985). Comparison of fiber types in skeletal muscles from ten animal species based on sensitivity of the myofibrillar actomyosin ATPase to acid or copper. *Histochemistry*, 82, 175-183.
- Matsakas, A., & Patel, K. (2009). Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histology and histopathology*.
- Matsuoka, H., and Hasegawa, Y. (2007). Myology and osteology of the Whooper Swan *Cygnus cygnus* (Aves: Anatidae) Part 1. Muscles attached to the sternum, coracoid, clavicle, scapula and humerus. *Bulletin of the Gunma Museum of Natural History*, 11, 7-14.
- Mayachitra, I. 2006. Bring State-of-Art Image Informatics Solutions to Your Desktop. Accessed Jan. 2019. https://mayachitra.com/wpcontent/uploads/2017/03/Mayachitra_Brochure_Web.pdf.
- Mayeuf-Louchart, A., Hardy, D., Thorel, Q., Roux, P., Gueniot, L., Briand, D., ... & Danckaert, A. (2018). MuscleJ: a high-content analysis method to study skeletal muscle with a new Fiji tool. *Skeletal muscle*, 8, 1-11.
- Mayne, C. N., Anderson, W. A., Hammond, R. L., Eisenberg, B. R., Stephenson, L. W., & Salmons, S. (1991). Correlates of fatigue resistance in canine skeletal muscle stimulated electrically for up to one year. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 261(2), C259-C270.
- McCormick, K. M., & Schultz, E. (1992). Mechanisms of nascent fiber formation during avian skeletal muscle hypertrophy. *Developmental biology*, 150(2), 319-334.
- McFarland, J. C., & Meyers, R. A. (2008). Anatomy and histochemistry of hindlimb flight posture in birds. I. The extended hindlimb posture of shorebirds. *Journal of Morphology*, 269(8), 967-979.
- McKee, S. (2003). Muscle fiber types in broilers and their relationship to meat quality. *Poultry Science*, 1952-2003.
- McLennan, I. S. (1983). Differentiation of muscle fiber types in the chicken hindlimb. *Developmental biology*, 97(1), 222-228.
- Meng, H., Janssen, P. M., Grange, R. W., Yang, L., Beggs, A. H., Swanson, L. C., ... & Lawlor, M. W. (2014). Tissue triage and freezing for models of skeletal muscle disease. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (89), e51586.

- Meunier, B., Labas, R., Picard, B., & Astruc, T. (2010). Typage des fibres musculaires bovines sur coupes immuno-histologiques par une méthode innovante d'analyse d'images. *Proceeding: 13èmes Journées" Sciences du Muscle et Technologie des Viandes», JSMTV, Clermont-Ferrand. France, 243-244.*
- Miraglia, D., Mammoli, R., Branciarri, R., Ranucci, D., & Cenci Goga, B. T. (2006). Characterization of muscle fibre type and evaluation of the presence of giant fibres in two meat chicken hybrids. *Veterinary Research Communications, 30*, 357-360.
- Mizuno, T., & Hikami, Y. (1971). Comparison of muscle growth between meat-type and egg-type chickens. *Japanese Journal of Zootechnical Science, 42*(10), 526-532.
- Morita, S., Iwamoto, H., Fukumitsu, Y., Gotoh, T., Nishimura, S., & Ono, Y. (2000). Heterogeneous composition of histochemical fibre types in the different parts of M. longissimus thoracis from Mishima (Japanese native) steers. *Meat science, 54*(1), 59-63.
- Mula, J., Lee, J. D., Liu, F., Yang, L., & Peterson, C. A. (2013). Automated image analysis of skeletal muscle fiber cross-sectional area. *Journal of Applied Physiology, 114*(1), 148-155.
- Nimmo, M. A., & Snow, D. H. (1983). The effect of ageing on skeletal muscle fibre characteristics in two inbred strains of mice. *Journal of Physiology (UK).*
- Ott, M., Robert, B., & Buckingham, M. (1990). The muscle, where does it come from. *M S-Medicine Sciences, 6*(7), 653-663.
- Ozawa, S., Mitsunashi, T., Mitsumoto, M., Matsumoto, S., Itoh, N., Itagaki, K., ... & Dohgo, T. (2000). The characteristics of muscle fiber types of longissimus thoracis muscle and their influences on the quantity and quality of meat from Japanese Black steers. *Meat Science, 54*(1), 65-70.
- Papinaho, P. A., Ruusunen, M. H., Suuronen, T., & Fletcher, D. L. (1996). Relationship between muscle biochemical and meat quality properties of early deboned broiler breasts. *Journal of Applied Poultry Research, 5*(2), 126-133.
- Pernuš, F., & Eržen, I. (1991). Arrangement of fiber types within fascicles of human vastus lateralis muscle. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine, 14*(4), 304-309.
- Peter, J. B., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A., & Stempel, K. E. (1972). Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry, 11*(14), 2627-2633.
- Pette, D., & Staron, R. S. (1990). *Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers* (pp. 1-76). Springer Berlin Heidelberg.
- Philippi, M. A. R. I. A., & Sillau, A. H. (1994). Oxidative capacity distribution in skeletal muscle fibers of the rat. *The Journal of experimental biology, 189*(1), 1-11.
- Picard, B., Gagnière, H., Robelin, J., & Geay, Y. (1995). Comparison of the foetal development of muscle in normal and double-muscled cattle. *Journal of Muscle Research & Cell Motility, 16*(6), 629-639.

- Picard, B., Lefaucheur, L., Fauconneau, B., Rémignon, H., Cherel, Y., Barrey, E., & Nedelec, J. (1998). Dossier: Caractérisation des différents types de fibres musculaires dans plusieurs espèces: production et utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les chaînes lourdes de myosine rapide IIa et IIb. *INRAE Productions Animales*, 11(2), 145-163.
- Picard, B., Lefaucheur, L., Berri, C., & Duclos, M. J. (2002). Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reproduction Nutrition Development*, 42(5), 415-431.
- Picard, B., & Cassar-Malek, I. (2009). Evidence for expression of IIb myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of Blonde d'Aquitaine bulls. *Meat Science*, 82(1), 30-36.
- Picard, B., & Gagaoua, M. (2020). Muscle fiber properties in cattle and their relationships with meat qualities: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(22), 6021-6039.
- Picard, B., Jurie, C., Cassar-Malek, I., & Hocquette, J. F. (2003). Typologie et ontogénèse des fibres musculaires chez le bovin. *INRAE Productions Animales*, 16(2), 125-131.
- Prentis, P. F., Penney, R. K., & Goldspink, G. (1984). Possible use of an indicator muscle in future breeding experiments in domestic fowl. *British Poultry Science*, 25(1), 33-41.
- Puolanne, E., Ruusunen, M. A. R. I. T. A., Voutila, L. I. I. S. A., & Yla-Ajos, M. (2006). Growth rate, muscle physiology, carcass traits and meat quality in pigs-A collage of studies on pigs at the University of Helsinki. *ARCHIV FUR TIERZUCHT*, 49(1), 126.
- Rehfeld, C., Weikard, R., & Reichel, K. (1994). Effects of the b-adrenergic agonist clenbuterol on skeletal muscle growth in rats. *Archives of Animal Nutrition-Archiv fur Tierernahrung*, 45(4), 333-344.
- Rehfeldt, C., & Weikard, R. (1995). Cellular response of muscle to porcine somatotropin (pST) in pigs. *Schriftenreihe des Forschungsinstitutes fuer die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (Germany)*.
- Rehfeldt, C., Stickland, N. C., Fiedler, I., & Wegner, J. (1999). Environmental and genetic factors as sources of variation in skeletal muscle fibre number. *BAM-PADOVA*-, 9(5), 235-254.
- Rehfeldt, C., Fiedler, I., Dietl, G., & Ender, K. (2000). Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Livestock Production Science*, 66(2), 177-188.
- Rehfeldt, C., Fiedler, I., & Stickland, N. C. (2004). Number and size of muscle fibres in relation to meat production. *Muscle development of livestock animals: physiology, genetics and meat quality*, 1-38.
- Remignon, H. (1993). Contribution à l'étude histologique et biochimique des muscles dans deux lignées de poulets à croissance lente ou rapide (Doctoral dissertation, Clermont-Ferrand 2).
- Remignon, H., Lefaucheur, L., Blum, J. C., & Ricard, F. H. (1994). Effects of divergent selection for body weight on three skeletal muscles characteristics in the chicken. *British Poultry Science*, 35(1), 65-76.

- Remignon, H., Gardahaut, M. F., Marche, G., & Ricard, F. H. (1995). Selection for rapid growth increases the number and the size of muscle fibres without changing their typing in chickens. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 16(2), 95-102.
- Rémignon, H., Desrosiers, V., & Marche, G. (1996). Influence of increasing breast meat yield on muscle histology and meat quality in the chicken. *Reproduction Nutrition Development*, 36(5), 523-530.
- Remignon, H. & Desrosiers, V. (1998). Determination of antibodies against different muscle fibers in chickens. *Productions Animales (France)*.
- Renand, G., Picard, B., Touraille, C., Berge, P., & Lepetit, J. (2001). Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat science*, 59(1), 49-60.
- Robelin, J., Picard, B., Listrat, A., Jurie, C., Barboiron, C., Pons, F., & Geay, Y. (1993). Myosin expression in semitendinosus muscle during fetal development of cattle: immunocytochemical and electrophoretic analyses. *Reproduction Nutrition Development*, 33(1), 25-41.
- Rosenblatt, J. D., & Woods, R. I. (1992). Hypertrophy of rat extensor digitorum longus muscle injected with bupivacaine. A sequential histochemical, immunohistochemical, histological and morphometric study. *Journal of anatomy*, 181(Pt 1), 11.
- Rosser, B.W., George, J.C., (1995). Histochemical characterisation and distribution of fiber types in pectoralis muscle of ostrich (*Struthio camellus*) and emu (*Dromaius navaehollandiae*). *acta zool*, 66, 191-198.
- Rosser, B. W. C., Waldbillig, D. M., Wick, M., & Bandman, E. (1996). Heterogeneity of myosin heavy-chain expression in fast-twitch fiber types of mature avian pectoralis muscle. *Biochemistry and Cell Biology*, 74(5), 715-728.
- Roy, R. R., Baldwin, K. M., & Edgerton, V. R. (1991). 8 The plasticity of skeletal muscle: effects of neuromuscular activity. *Exercise and sport sciences reviews*, 19(1), 269-312.
- Roy, R. R., Pierotti, D. J., & Edgerton, V. R. (1996). Skeletal muscle fiber cross-sectional area: effects of freezing procedures. *Cells Tissues Organs*, 155(2), 131-135.
- Rüegg, M. A., and S. Meinen. 2014. Quantitative Determination of Minimal Feret's Diameter, Including the Evaluation of the Percentage of Centralized Nuclei, Fiber Numbers, Cross-Sectional Area and the Percentage of Fibrosis. Treat-NMD Neuromuscular Network, CURE CMD Congenital muscular Dystrophy MDC1A_M.1.2.0021.0 April 19th, 2011 January 28th. Accessed June 2021. http://www.treatnmd.eu/downloads/file/sops/cmd/MDC1A_M.1.2.002.pdf.
- Ryu, Y. C., Rhee, M. S., & Kim, B. C. (2004). Estimation of correlation coefficients between histological parameters and carcass traits of pig longissimus dorsi muscle. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 17(3), 428-433.
- Ryu, Y. C., Choi, Y. M., Lee, S. H., Shin, H. G., Choe, J. H., Kim, J. M., ... & Kim, B. C. (2008). Comparing the histochemical characteristics and meat quality traits of different pig breeds. *Meat science*, 80(2), 363-369.

- Sapkota, M., Xing, F., Liu, F., & Yang, L. (2015). Skeletal muscle cell segmentation using distributed convolutional neural network. *Proc's High Performance Computing in Biomedical Image Analysis (HPC-MICCAI)*.
- Schadereit, R., Klein, M., Rehfeldt, C., Kreienbring, F., & Krawielitzki, K. (1995). Influence of nutrient restriction and realimentation on protein and energy metabolism, organ weights, and muscle structure in growing rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 74(1-5), 253-268.
- Schantz, P., RANDALL-FOX, E., Hutchison, W., Tydén, A., & Åstrand, P. O. (1983). Muscle fibre type distribution, muscle cross-sectional area and maximal voluntary strength in humans. *Acta Physiologica Scandinavica*, 117(2), 219-226.
- Scheuermann, G. N., Bilgili, S. F., Tuzun, S., & Mulvaney, D. R. (2004). Comparison of chicken genotypes: myofiber number in pectoralis muscle and myostatin ontogeny. *Poultry Science*, 83(8), 1404-1412.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.
- Sertel, O., B. Dogdas, C. S. Chiu, and M. N. Gurcan. 2011. Microscopic image analysis for quantitative characterization of muscle fiber type composition. *Comp. Med. Imag. and Graph.* 35:616–628.
- Shafiq, S. A., Askanas, V., & Milhorat, A. T. (1971). Fiber types and preclinical changes in chicken muscular dystrophy. *Archives of Neurology*, 25(6), 560-571.
- Shorey, C. D., & Cleland, K. W. (1983). Problems associated with the morphometric measurement of transverse skeletal muscle fibers: I. Analysis of frozen sections. *The Anatomical Record*, 207(3), 523-531.
- Sifre, L., André, B., & Coton, J. P. (2009). Development of a system to quantify muscle fibre destructuration. *Meat science*, 81(3), 515-522.
- Singh, K., Melis, E. H., Richmond, F. J., & Scott, S. H. (2002). Morphometry of *Macaca mulatta* forelimb. II. Fiber-type composition in shoulder and elbow muscles. *Journal of morphology*, 251(3), 323-332.
- Smith, D. P., & Fletcher, D. L. (1988). Chicken breast muscle fiber type and diameter as influenced by age and intramuscular location. *Poultry Science*, 67(6), 908-913.
- Smith, J. H. (1963). Relation of body size to muscle cell size and number in the chicken. *Poultry Science*, 42(2), 283-290.
- Smith, N. C., Payne, R. C., Jespers, K. J., & Wilson, A. M. (2007). Muscle moment arms of pelvic limb muscles of the ostrich (*Struthio camelus*). *Journal of Anatomy*, 211(3), 313-324.
- Solomon, M. B., Campbell, R. G., & Steele, N. C. (1990). Effect of sex and exogenous porcine somatotropin on longissimus muscle fiber characteristics of growing pigs. *Journal of Animal Science*, 68(4), 1176-1181.

- Soussi-Yanicostas, N. (1991). L'ontogenèse musculaire: de l'induction mésodermique à la formation du sarcomère. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 89(4), 255-295.
- Stål, P., Eriksson, P. O., Schiaffino, S., Butler-Browne, G. S., & Thornell, L. E. (1994). Differences in myosin composition between human oro-facial, masticatory and limb muscles: enzyme-, immunohisto- and biochemical studies. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 15, 517-534.
- Staron, R. S., & Pette, D. (1987). The multiplicity of combinations of myosin light chains and heavy chains in histochemically typed single fibres. Rabbit soleus muscle. *Biochemical Journal*, 243(3), 687-693.
- Stevens, C. R., Berenson, J., Sledziona, M., Moore, T. P., Dong, L., & Cheetham, J. (2020). Approach for semi-automated measurement of fiber diameter in murine and canine skeletal muscle. *Plos one*, 15(12), e0243163.
- Stockdale, F. E. (1990). The myogenic lineage : evidence for multiple cellular precursors during avian limb development. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 194(2), 71-75.
- Strange, H., Scott, I., & Zwiggelaar, R. (2014). Myofibre segmentation in H&E stained adult skeletal muscle images using coherence-enhancing diffusion filtering. *BMC Medical Imaging*, 14(1), 1-13.
- Suzuki, A., Tsuchiya, T., Ohwada, S., & Tamate, H. (1985). Distribution of myofiber types in thigh muscles of chickens. *Journal of Morphology*, 185(2), 145-154.
- Swatland, H. J. (1973). Muscle growth in the fetal and neonatal pig. *Journal of Animal Science*, 37(2), 536-545.
- Swatland, H. J. (1980). Muscle fiber histochemistry in breast and leg meat of geese. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 13(3), 135-136. vraie
- Swatland, H. J. (1984). *Structure and development of meat animals*. Prentice Hall, Inc..
- Tamaki, T. E. T. S. U. R. O., Uchiyama, S. H. U. I. C. H. I., & Nakano, S. H. O. I. C. H. I. (1992). A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Medicine and science in sports and exercise*, 24(8), 881-886.
- Thompson, L. V. (2002). Skeletal muscle adaptations with age, inactivity, and therapeutic exercise. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, 32(2), 44-57.
- Thornell, L. E., Carlsson, L., Eriksson, P. O., Liu, J. X., Österlund, C., Stål, P., & Pedrosa-Domellöf, F. (2015). Fibre typing of intrafusal fibres. *Journal of anatomy*, 227(2), 136-156.
- Torrella, J. R., Fouces, V., Palomeque, J., & Viscor, G. (1996). Capillarity and fibre types in locomotory muscles of wild mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Journal of Comparative Physiology B*, 166, 164-177.

- Toutant, J. P., Toutant, M. N., Renaud, D., & Le Douarin, G. H. (1980). Histochemical differentiation of extrafusil muscle fibres of the anterior latissimus dorsi in the chick. *Cell differentiation*, 9(6), 305-314.
- Trappe, S., Gallagher, P., Harber, M., Carrithers, J., Fluckey, J., & Trappe, T. (2003). Single muscle fibre contractile properties in young and old men and women. *The Journal of physiology*, 552(1), 47-58.
- Tůmová, E., & Teimouri, A. (2009). Chicken muscle fibres characteristics and meat quality: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 40(4), 253-258.
- Valin, C. (1988). Différenciation du tissu musculaire. Conséquences technologiques pour la filière viande. *Reproduction Nutrition Développement*, 28(3B), 845-856
- Van Wessel, T., De Haan, A., Van Der Laarse, W. J., & Jaspers, R. T. (2010). The muscle fiber type–fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism?. *European journal of applied physiology*, 110, 665-694.
- Velloso, C. P. (2008). Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *British journal of pharmacology*, 154(3), 557-568.
- Verdiglione, R., & Cassandro, M. (2013). Characterization of muscle fiber type in the pectoralis major muscle of slow-growing local and commercial chicken strains. *Poultry Science*, 92(9), 2433-2437.
- Wang, Z. (2016). A semi-automatic method for robust and efficient identification of neighboring muscle cells. *Pattern recognition*, 53, 300-312.
- Wegner, J., Albrecht, E., Fiedler, I., Teuscher, F., Papstein, H. J., & Ender, K. (2000). Growth- and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *Journal of animal science*, 78(6), 1485-1496.
- Wen, Y., Murach, K. A., Vechetti Jr, I. J., Fry, C. S., Vickery, C., Peterson, C. A., ... & Campbell, K. S. (2018). MyoVision: software for automated high-content analysis of skeletal muscle immunohistochemistry. *Journal of Applied Physiology*, 124(1), 40-51.
- Wiesmann, V., Franz, D., Held, C., Münzenmayer, C., Palmisano, R., & Wittenberg, T. (2015). Review of free software tools for image analysis of fluorescence cell micrographs. *Journal of microscopy*, 257(1), 39-53.
- Yamaguchi, A., Horio, Y. O. U. J. I., Sakuma, K. U. N. I. H. I. R. O., & Katsuta, S. H. I. G. E. R. U. (1993). The effect of nutrition on the size and proportion of muscle fibre types during growth. *Journal of Anatomy*, 182(Pt 1), 29.
- Zalewska, E., Nandedkar, S. D., & Hausmanowa-Petrusewicz, I. (2012). A method for determination of muscle fiber diameter using single fiber potential (SFP) analysis. *Medical & biological engineering & computing*, 50, 1309-1314. **Text Zalewska et al., 2014**
- Zhao, G. P., Cui, H. X., Liu, R. R., Zheng, M. Q., Chen, J. L., & Wen, J. (2011). Comparison of breast muscle meat quality in 2 broiler breeds. *Poultry Science*, 90(10), 2355-2359.

- Žikić, D., Stojanović, S., Đukić-Stojčić, M., Kanački, Z., Milošević, V., & Ušćebrka, G. (2016). Morphological characteristics of breast and thigh muscles of slow-and medium growing strains of chickens. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 32(1), 27-35.
- Zimmermann, F. C., Fallavena, L. C. B., Salle, C. T. P., Moraes, H. L. S., Soncini, R. A., Barreta, M. H., & Nascimento, V. P. (2012). Downgrading of heavy broiler chicken carcasses due to myodegeneration of the anterior latissimus dorsi: pathologic and epidemiologic studies. *Avian Diseases*, 56(2), 418-421.

PUBLICATION

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056617121000362>

Comparative study of histological and histo-chemical image processing in muscle fiber sections of broiler chicken

A. Achouri,^{*,†,1} M. Melizi,[†] H. Belbedj,^{*,†} and A. Azizi[†]

**Department of Veterinary, Laboratory of Anatomy, Institute of Agriculture and Veterinary Sciences, Mohamed-Cherif Messaadia University, Souk Ahras, Algeria; and [†]Department of Veterinary, Veterinary Sciences and Agricultural Sciences Institute, University of Batna-1, 05000 Batna, Algeria*

Primary Audience: Muscle Biology, Image Processing, Poultry Growth

SUMMARY

The image processing of muscular fibers has seen significant improvements over the last decades, from light microscopy acquisition to virtual microscopy and from manual segmentation and fiber typing to automatic. The present study aims to discuss the main tools employed in different histo-enzymological image processing phases applied to muscle fibers, which are respectively: the acquisition, segmentation and fiber typing as well as their efficiency in the determination of morphometric parameters.

First, the acquisition: to count the cell numbers within the muscle fiber sections, optical microscopic images with different magnifications (x100, x200, x250, and x400) were compared with virtual slides digitized by Slide Scanner. Second, the segmentation: Three softwares (Fiji “Digitizing pen, Mouse”, Image Pro Plus 10 [semi-automatic], and Cytoinformatics LLC [automatic]) were compared for image segmentation quality and the determining of fiber numbers. Third, manual fiber typing: employing Fiji of segmented images using the 3 previously mentioned softwares were performed to calculate the accuracy of the morphometric parameter (Cross sectional Area [CSA], perimeter and Minimal Feret’s Diameter [MFD]). The results of the acquisition showed that the scanner slides have a better resolution and detected a higher number of cells than when optical microscopes with different magnifications were used; with the latter, the processing can be performed only with an acceptable resolution, where the number of cells is lesser, which unfortunately requires several repetitions and exhausting work. Our findings regarding segmentation indicate that the Cytoinformatics LLC showed the best processing time and the highest quality followed by IP and Fiji. Finally and for the ultimate step, the morphometric parameter calculation: showed that the best accuracy was attained by using Fiji followed by Cytoinformatics and finally by IP. The findings of this study suggest that Fiji (semi-automatic) showed the best quality/price ratio (open access software) for segmentation and fiber typing, but it proved to be time consuming when compared to Image Pro Plus 10 (semi-automatic) and Cytoinformatics LLC (automatic).

Key words: muscle fiber, histo-enzymology, image acquisition, segmentation, fiber typing

2021 J. Appl. Poult. Res. 30:100173

<https://doi.org/10.1016/j.japr.2021.100173>

¹Corresponding author: abdelhamid.achouri@univ-soukahras.dz

DESCRIPTION OF THE PROBLEM

Muscle histological image processing is a vast field that encompasses all the methods and techniques employed to make the processing simpler and faster with improved image visual aspects and extracted relevant data. Currently, histo-enzymological muscle image processing (histological and histo-chemical) is successfully used in muscle fiber typing, as well as in the determination of their morphometric parameters (number, Cross Sectional Area [CSA], Minimal Feret's Diameter [MFD] and perimeter). The mastery of histo-enzymological image processing requires 3 main determinants: excellent image acquisition, perfect segmentation, and adequate fiber typology.

For the microscopic acquisition of muscle histological image, several magnifications were applied in the same research, aiming to reach an acceptable level of studied fibers, thus influencing the accuracy of the results. Total magnification of x200 was commonly used (Liu et al. 2013; Mula et al., 2013; Wiesmann et al., 2014; Wen et al., 2018; Desgeorges et al., 2019) compared to x40 (Garton et al., 2010); x50 (Sifre et al., 2009); x100 (Meunier et al., 2010; Kostrominova et al., 2013; Mula et al., 2013; Rüegg and Meinen, 2014; Strange et al., 2014); x400 (Eržen & Maravić, 1993). However, researchers were unable to capture the entire surface of a given stained section, which covered the whole area of a muscle, into a single image, as a consequence some of them were forced to perform several images with low magnification. Garton et al. (2010) and Wen et al. (2018) were used respectively x40 and x200 total magnification images covering the entire muscle surface, in order to stitch them into a single complete image using Photoshop. Moreover, there is considerable regional variability in fiber size in some muscles; therefore, measuring or sampling only a few small areas will not necessarily provide representative measures (Liu et al., 2013). In recent years, bioinformatics researchers have successfully developed scanners that digitize slides sections colored by histo-enzymological reactions (Strange et al., 2014; Mayeuf-Louchart et al., 2018; Cui et al., 2019; Desgeorges et al., 2019).

Similar to acquisition, the segmentation of histological muscle image into distinct fibers to calculate their morphometric parameters is difficult; also, simple thresholding or morphology techniques have known serious difficulties when trying to separate precisely tightly affixed fibers (Dryden et al., 2006; Garton et al., 2010; Liu et al., 2013). To overcome these limitations, researchers use universal semi-automatic methods for image processing of different types of tissue (Fiji, Schneider et al., (2012), Image Pro Plus "Media Cybernetics", Metamorph "Universal Imaging Corporation"), and specialized ones for processing histo-enzymological images of muscle tissues (Buche and Mauron., 1997, Klemencic et al. 1998, Karen et al., 2009, Wang, 2016). In parallel, the development of completely automated methods for the histo-enzymological image processing of the muscle has gradually occurred (Sertel et al., 2011, Janssens et al., 2013; Liu et al., 2013; Strange et al., 2014; Sapkota et al., 2015; Cui et al., 2019). The automated software is more efficient (i.e., the boundaries between muscle fibers are well defined and more discriminating information is obtained).

The methods of typing muscle fibers are highly advanced and developed, starting with manual typing techniques (Pernuš and Eržen., 1991), followed by interactive tools, which measure the optical density of the fibers using spectro-photo-microscopy (Bye et al., 1989; Klemencic et al., 1998), and finally, skeletonization approaches of the inter-fiber network in different serial sections, which classify fibers according to the grey levels of muscle cells (Henckel, 1989; Buche and Mauron., 1997). Recently, there was an emergence of automated tools that classify the fibers according to their densitometry by superimposing various serial sections colored differently on a reference image (Meunier et al., 2010; Kostrominova et al., 2013).

To our knowledge, no study has compared muscle image acquisition methods between light microscopy and slide scanner, with a focus on image quality and numbers of fibers studied per image. Also, very few studies have compared between image analysis tools regarding their applicability to the micrography of muscle

cells and various segmentation and analysis tasks. Therefore, choosing a suitable tool for the analysis of muscle fiber images remains a challenge.

In order to perform a suitable processing of the histological image of skeletal muscle tissue and bridging the chasm that exists between image processing methods and muscle scientists, we have chosen 3 muscles of broiler chicken, on which we carried out this work. The study aims, in its first part, to compare the processing of classical histo-enzymological images of muscle tissue in terms of image acquisition by light microscopy and slide scanner. In its second part, to compare 3 softwares in terms of segmentation, where two are semi-automatic (Fiji and Image Pro Plus 10 [IP]) and one automatic which belongs to the Cytoinformatics LLC group. In the third part, we try to explain our method of muscle fibers typing in order to calculate their morphometric characteristics.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were conducted at the Laboratory of Anatomy of Institute of Agricultural and Veterinary Sciences of Souk Ahras University according to internationally and national accepted standards (European Directive 86/609/EEC of 24 November 1986, and national executive decree No. 95-363 of November 11, 1995, Algeria; [Algeria, 1995](#)).

Study Design and Methods

Serial images used in this study are from an unpublished research conducted on morphology and histo-enzymology of 3 different types of muscles (Pectoralis superficialis, Sartorius mixed part, Sartorius rapid part, and Anterior Latissimus Dorsi [ALD]) in broiler chickens.

This study was carried out on chickens at different post-hatching ages, respectively: D0, D7, D14, D21, D28, D35, D42, D49 and D56, with 10 replicates for each age. For each muscle, we performed 3 serial sections mounted on 3 different slides and differently colored. The first one was stained with red azorubin (considered as a reference slide), the second was intended to reveal the metabolic activity of the

enzyme Succinate Dehydrogenase and the third was pre-incubated in an ATPase solution with a pH of 4.10, to reveal the contractile activity. The 3 slides were fully scanned using Leica Slide Scanner (Leica) at 40x magnification by the Cytoinformatics LLC group (Lexington, KY) and recorded in Aperio-SVS format.

For the visualization of scanned slides, Image Scope software (v12.3.2.8013) was used. Serial images were recorded in JPEG format from image scope, where a single serial image was selected for each muscle and age studied. All red azorubin stained images were segmented by Cytoinformatics (**CytoF**).

Only ALD muscle was selected for our comparative study, because it is a slow type, and contains more conjunctive tissue and less overlapping fibers that make image processing easy to perform.

Image Acquisition

From 90 images segmented by the Cytoinformatics group, 63 images of ALD muscle stained with red azorubin were chosen, approximately 7 images for each category of age. The same areas selected from the 63 images, were also captured with different magnifications (x10, x20, x25, x40) for red azorubin images using light microscopy (Optika B-293) equipped with an integrated camera (18MP of resolution). Muscle cells' number determination in each image was performed by Cell Counter application in Fiji software, and the results were compared with their contemporaries segmented using CytoF ([Figure 1](#)).

Segmentation

For each category of age, one image of red azorubin was selected randomly from the 90 images of the ALD muscle. A total of 9 images were segmented again in order to calculate the time required for each image using 2 universal semi-automatic software, that are, IP (Image Pro Plus 10, Media Cybernetics [USA], trial version "10.0.2 build 6912") and Fiji ([Schneider et al., 2012](#), a new free release of ImageJ). Fiji segmentation was conducted by 2 methods: one using the computer mouse (**FM**) and the other, a digitizing pen (**FDP**).

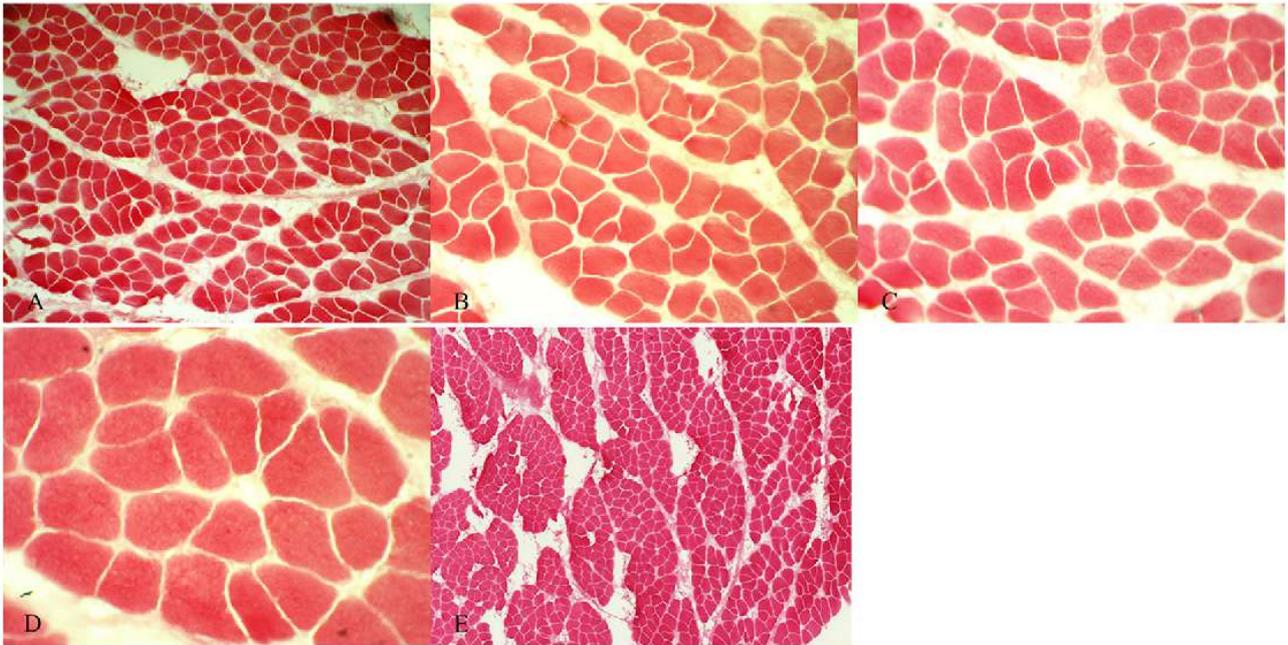


Figure 1. Images of the Anterior Latissimus Dorsi muscle of a 35-day-old chicken captured by an Optika microscope x10 (A), x20 (B), x25 (C), x40 and (D) objectives. (E) Whole Slide Imaging scanned by CytoF.

For these 2 softwares the segmentation was conducted in 2 steps:

Muscle Fiber Individualization: We separated only the overlaying fibers. For IP, the segmentation takes place in two steps (Figure 2). Firstly, automatic segmentation realized with a variance filter in the green channel in order to improve muscle fibers' boundaries and obtain image with areas of segmented and nonsegmented fibers (black arrows in image A). Secondly, manual segmentation by digitizing pen leaves behind a purple striation around the nonsegmented fibers (black arrows in image B), that require a second one to obtain a better quality of segmentation (image C). The tool "Mask all frames" in option of the IP software was applied to image C to obtain the final image D.

Similarly, FDP and FM require two steps to achieve the segmentation (Figure 3). The thresholding tool on the red azorubin image gives us an image (A) with a large number of muscle fibers' which are not segmented. Manual segmentation conducted on image (B) with 2 techniques, digitizing pen and computer mouse (C).

The thresholding with the two software Fiji "FDP, FM" and IP merge the closely overlaying muscle cells, which requires some concentration of the manipulator at the time of segmentation to separate them.

Post Processing of Segmented Images: After segmentation, the postprocessing step with the

Fiji software is aimed at removing the artefacts, irrelevant tissues and separating any overlaying muscle cells from the segmented images (by Fiji "FDP, FM", CytoF and IP), also to calculating the time required for this operation for each software (Figure 4).

Typology of Muscle Fibers

The same areas from the nine previously segmented red azorubin images were also selected for images revealing ATPase activity (Figure 5). Slides showing SDH activity were not considered because all the fibers of this muscle shows a positive reaction.

Red azorubin images segmented by the 3 software (Fiji "FDP, FM", CytoF and IP) were considered later as reference images in Fiji for fibers' typing and their morphometric parameters (Number, CSA, MFD and Perimeter); this selection was done on segmented image using the Fiji "Add to Manager" tool based on the image that reveals the ATPase activity (Figure 5).

Statistical Methods

Multiple comparisons between images recorded from Scanner Slide and light microscopy at different magnifications regarding the number muscle fibers (image acquisition) at different

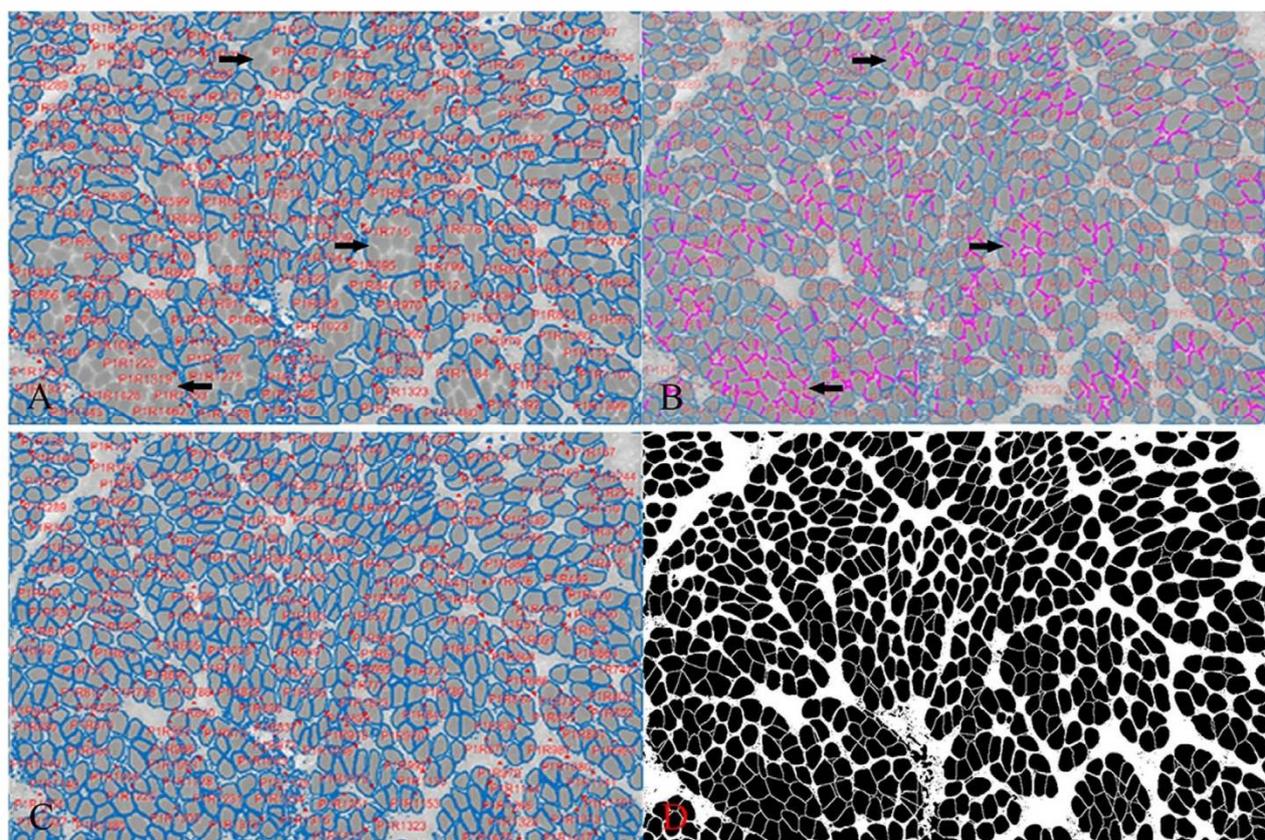


Figure 2. The steps of segmentation by IP of Anterior Latissimus Dorsi muscle image from 14-day-old broiler stained with red azorubin. (A) Automatic segmentation, (B) manual segmentation, (C) mask all frame tool application, (D) final image.

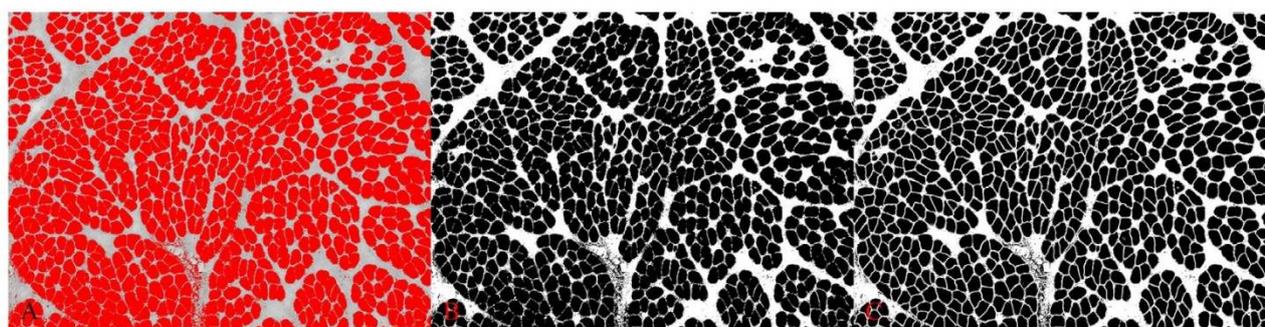


Figure 3. The steps of segmentation by Fiji (FDP, FM) of Anterior Latissimus Dorsi muscle image of a 14-day-old chicken stained with red azorubin. (A) The thresholding tool application, (B) manual segmentation, (C) final image.

ages using ANOVA followed by Bonferroni correction for multiple comparison tests.

Multiple descriptive comparisons regarding the segmentation methods were conducted using Excel between:

- Two different segmentation methods of Fiji software “FDP, FM”, and IP concerning the time required for the segmentation of the 9 images.
- Three software packages Fiji “FDP, FM”, CytoF, and IP regarding the time required

for image post-processing and the numbers of fibers in the same image.

Comparison between the 3 softwares regarding fibers’ morphometric parameters (CSA, MFD, and Perimeter) were conducted using ANOVA followed by Tukey’s multiple comparison tests. Time required for segmentation and post processing were converted to minute to conduct comparison between the softwares regarding estimated time by ANOVA. All statistical analysis were performed using SPSS 22

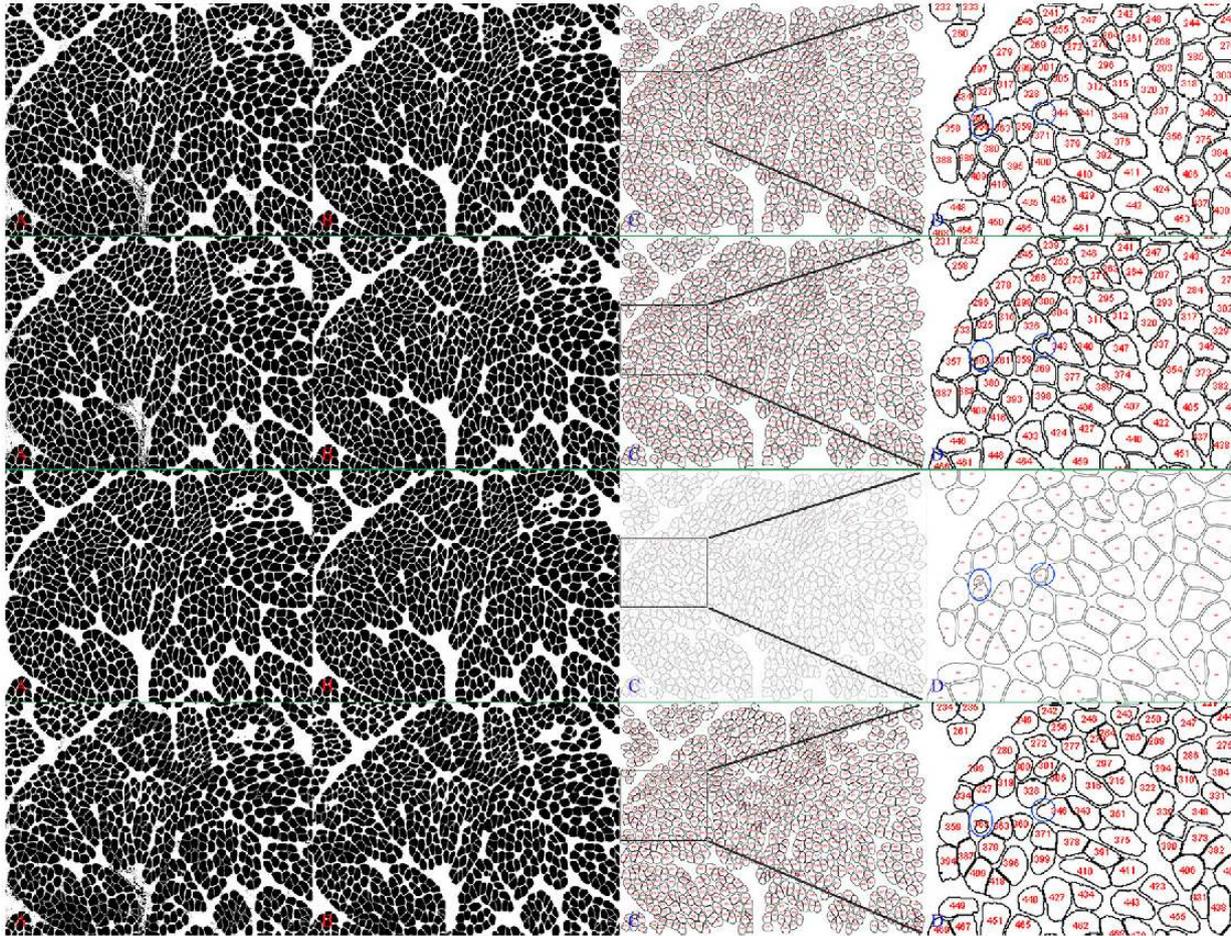


Figure 4. Post-processing of an image segmented by the 3 software (Fiji "FDP, FM", CytoF and IP) by Fiji. The four images in column (D) are enlargements of the places framed at random in column (C), CytoF software was the one that counted more fibers (circles in blue).

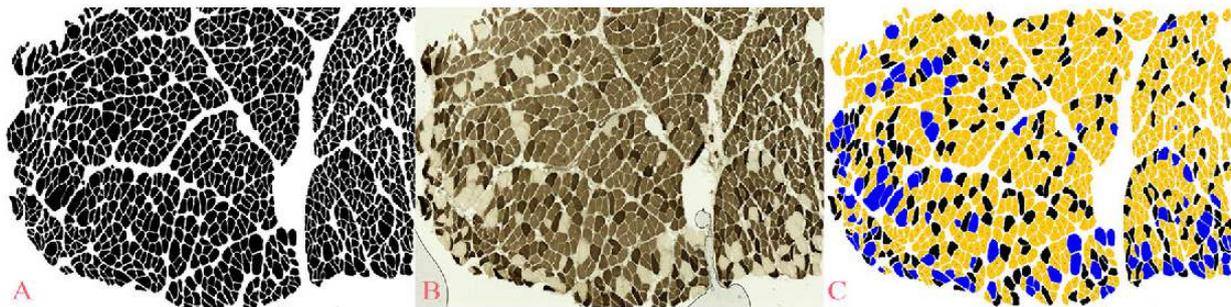


Figure 5. Selection of the different types of fibers IIIA (orange), IIIB (black) and IIA (blue) on the segmented image (A) according to the image which reveals the ATPase activity (B) to obtain image C.

and data were presented as Mean \pm SE and differences in means were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Overall results (mean \pm SE) are presented in Tables 1, 2, and 3 for different comparison

between automatic (CytoF) and semi-automatic (Fiji "FDP, FM", and IP) software regarding the number of fibers and the morphometric parameters.

Image Acquisition

There is a significant difference between Slide Scanner and different magnifications of

Table 1. Multiple comparisons at different ages of chicken broiler for muscle fibers numbers determination between different magnifications of light microscopy and Slide Scanner (n = 63).

Age (days)	Fiber Number					<i>P</i> < 0.05
	M x10	M x20	M x25	M x40	SC	
0		950.00 ± 70.56 ^a	901.67 ± 60.99 ^a	233.33 ± 39.40 ^b	795.67 ± 64.78 ^a	0.0001
07	837.00 ± 56.40 ^a	227.00 ± 20.03 ^b	202.40 ± 10.94 ^b	64.20 ± 9.39 ^c	626.20 ± 44.83 ^a	0.0001
14	839.00 ± 112.07 ^a	253.00 ± 23.77 ^b	246.17 ± 20.13 ^b	66.83 ± 10.19 ^c	623.33 ± 65.70 ^a	0.0001
21	559.50 ± 50.19 ^a	161.50 ± 21.05 ^b	142.38 ± 18.33 ^b	40.88 ± 3.89 ^c	612.88 ± 70.88 ^a	0.0001
28	538.11 ± 59.37 ^a	122.56 ± 9.41 ^b	118.22 ± 8.21 ^b	29.56 ± 2.58 ^c	653.67 ± 131.42 ^a	0.0001
35	295.43 ± 20.54 ^a	77.57 ± 7.33 ^b	69.43 ± 6.32 ^b	17.57 ± 1.93 ^c	867.29 ± 131.84 ^d	0.0001
42	329.75 ± 16.68 ^a	79.25 ± 3.99 ^b	76.63 ± 6.43 ^b	18.00 ± 1.66 ^c	988.25 ± 46.34 ^d	0.0001
49	290.63 ± 19.01 ^a	69.25 ± 4.03 ^b	58.00 ± 6.12 ^b	14.63 ± 1.87 ^c	888.00 ± 90.99 ^d	0.0001
56	222.57 ± 17.15 ^a	57.86 ± 4.46 ^b	45.57 ± 3.10 ^b	11.86 ± 0.76 ^c	780.14 ± 82.66 ^d	0.0001
Mean	467.71 ± 32.8 ^a	201.31 ± 32.2 ^b	187.25 ± 30.6 ^b	49.72 ± 8.6 ^c	765.20 ± 33.5 ^d	0.0001
<i>P</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.038	

P < 0.05.

Abbreviations: M, magnification of light microscopy; SC, slide scanner.

^{a-d}Comparisons are made within row between different types of acquisition using superscript letters.

Comparisons are made within column of each type of acquisition in function of age; the number fibers was determined using Cell Counter application in Fiji software.

light microscopy regarding the number of fibers (*P* < 0.0001, Table 1). The Scanned Slide showed the highest detection of the Mean number of fibers (765 ± 33.5) compared with different microscopic Mean magnifications; these were consecutively, x10 (468 ± 32.8), x20 (201 ± 32.2), x25 (187 ± 30.6) and x40 (50 ± 8.6). Multiple comparisons were also significant (*P* < 0.0001, Table 1) between

Slide Scanner and different magnifications of light microscopy at different age stages. As highlighted in Table 1, the number of fibers detected in muscle section images decrease gradually in function of age using different magnifications of light microscopy (*P* < 0.0001, Table 1); however, there is a slight increase of fibers in function of age detected by Slide Scanner (*P* < 0.038, Table 1).

Table 2. Total number of muscle fibers after segmentation, time required for fiber individualization and post processing evolution in function of age determined using 3 software (Fiji "FDP, FM", IP and CytoF) (n = 9).

Item	D0	D07	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	Mean ± SE
Total number of muscle fibers										
FM	737	534	736	401	334	714	1017	422	620	612.78 ± 71.64 ^a
FDP	732	528	735	409	338	703	1015	435	635	614.44 ± 70.25 ^a
IP	717	530	746	401	343	726	1026	408	622	613.22 ± 72.52 ^a
CytoF	706	517	751	416	348	734	1048	448	645	623.66 ± 72.36 ^a
<i>P</i>	0.999									
Time required for fiber individualization										
FM	5:39:20	3:15:17	2:01:01	1:34:24	0:55:32	2:51:40	3:00:01	1:57:16	2:37:16	2:39:05 ± 0.02 ^{a,b}
FDP	6:57:00	3:36:19	2:37:30	2:03:13	1:01:58	3:07:56	3:17:42	2:27:47	2:15:33	3:02:46 ± 0.02 ^a
IP	2:15:03	1:58:27	1:07:16	0:50:49	0:23:16	1:37:10	1:46:12	0:38:04	1:06:38	1:18:06 ± 0.01 ^b
<i>P</i>	0.021									
Time required for post processing										
FM	0:24:31	0:28:50	0:15:31	0:17:14	0:07:46	0:28:48	0:42:55	0:41:21	0:23:24	0:25:36 ± 0.003 ^{a,b}
FDP	0:25:29	0:27:15	0:16:14	0:17:35	0:09:52	0:30:31	0:41:56	0:41:05	0:25:56	0:26:13 ± 0.002 ^a
IP	1:19:13	1:09:41	0:26:52	0:31:40	0:13:37	0:20:38	0:50:09	0:35:52	0:36:55	0:40:31 ± 0.005 ^b
CytoF	0:26:31	0:11:13	0:03:35	0:05:37	0:03:56	0:07:31	0:09:29	0:10:46	0:11:26	0:10:00 ± 0.002 ^a
<i>P</i>	0.0009									

Abbreviations: D, day; FM, Fiji Mouse; FDP, Fiji Digitizing Pen; IP, Image Pro Plus 10; CytoF, cytoinformatics.

^{a,b}Comparisons are made within column regarding time between different software of segmentation using superscript letters.

Table 3. Multiple comparisons at different stages of age for fiber morphometries (CSA, perimeter, MFD) between FDP, FM, CytoF and IP segmented images (n = 63).

Fiber parameters	Age (days)	Software				P < 0.05
		FDP	FM	Cyto	IP	
CSA	1	162.28 ± 1.78 ^b	145.59 ± 1.73 ^c	155.52 ± 1.59 ^a	156.00 ± 1.88 ^{a,b}	0.0001
	7	999.96 ± 12.73 ^a	993.99 ± 16.08 ^{a,b}	970.56 ± 11.45 ^{a,b}	949.16 ± 12.26 ^b	0.017
	14	778.65 ± 7.86 ^b	743.45 ± 7.69 ^a	740.91 ± 7.32 ^a	718.89 ± 7.66 ^a	0.0001
	21	1350.73 ± 16.43 ^{a,b}	1390.82 ± 16.91 ^b	1326.78 ± 16.76 ^a	1319.65 ± 18.02 ^a	0.015
	28	1560.76 ± 26.46 ^a	1565.06 ± 26.69 ^a	1470.06 ± 25.15 ^a	1487.48 ± 25.26 ^a	0.013
	35	3013.37 ± 37.61 ^a	2934.64 ± 38.69 ^a	2914.07 ± 37.40 ^a	2774.29 ± 36.66 ^b	0.0001
	42	2072.81 ± 25.10 ^a	2060.46 ± 24.68 ^a	2063.37 ± 4.14 ^a	2014.60 ± 25.27 ^a	0.349
	49	2443.28 ± 23.81 ^b	2411.41 ± 26.67 ^{a,b}	2323.36 ± 29.80 ^{a,c}	2234.13 ± 29.23 ^c	0.0001
	56	4280.97 ± 48.05 ^a	4292.66 ± 47.02 ^a	4216.67 ± 48.80 ^a	3966.59 ± 44.63 ^b	0.0001
	Mean	1869.47 ± 18.57 ^a	1863.61 ± 19.44 ^a	1833.77 ± 18.92 ^a	1743.16 ± 17.82 ^b	0.0001
Perimeter	1	53.14 ± 0.32 ^b	49.35 ± 0.33 ^a	49.57 ± 0.28 ^a	51.15 ± 0.34 ^c	0.0001
	7	130.77 ± 0.99 ^b	131.17 ± 1.24 ^b	125.14 ± 0.85 ^a	123.45 ± 0.93 ^a	0.0001
	14	121.21 ± 0.74 ^b	118.12 ± 0.71 ^c	110.40 ± 0.60 ^a	108.94 ± 0.65 ^a	0.0001
	21	161.78 ± 1.18 ^b	160.96 ± 1.08 ^b	151.54 ± 1.19 ^a	150.11 ± 1.24 ^a	0.0001
	28	174.02 ± 1.72 ^b	171.16 ± 1.61 ^b	159.64 ± 1.49 ^a	158.33 ± 1.43 ^a	0.0001
	35	233.43 ± 1.77 ^b	230.90 ± 1.83 ^b	223.82 ± 1.88 ^a	217.71 ± 1.78 ^a	0.0001
	42	192.18 ± 1.34 ^a	193.46 ± 1.30 ^a	191.33 ± 1.31 ^a	184.88 ± 1.39 ^b	0.0001
	49	218.97 ± 1.37 ^b	216.72 ± 1.52 ^b	205.29 ± 1.81 ^a	196.80 ± 1.67 ^c	0.0001
	56	273.44 ± 1.94 ^a	276.59 ± 1.84 ^a	269.62 ± 2.08 ^a	251.23 ± 1.71 ^b	0.0001
	Mean	171.84 ± 0.99 ^b	171.83 ± 1.04 ^b	166.01 ± 0.99 ^a	159.45 ± 0.93 ^c	0.0001
MFD	1	12.45 ± 0.08 ^b	11.87 ± 0.09 ^a	12.09 ± 0.07 ^a	12.43 ± 0.09 ^b	0.0001
	7	31.56 ± 0.24 ^b	31.60 ± 0.30 ^{b,c}	30.48 ± 0.22 ^a	30.66 ± 0.23 ^{a,c}	0.001
	14	26.97 ± 0.17 ^b	26.34 ± 0.17 ^b	24.98 ± 0.16 ^a	25.41 ± 0.16 ^a	0.0001
	21	35.47 ± 0.29 ^b	35.57 ± 0.29 ^b	33.29 ± 0.31 ^a	34.00 ± 0.30 ^a	0.0001
	28	38.10 ± 0.42 ^{b,c}	38.21 ± 0.42 ^b	35.69 ± 0.43 ^a	36.53 ± 0.40 ^{a,c}	0.0001
	35	52.66 ± 0.42 ^b	52.19 ± 0.43 ^b	49.79 ± 0.44 ^a	50.12 ± 0.41 ^a	0.0001
	42	42.74 ± 0.33 ^b	43.20 ± 0.32 ^b	41.13 ± 0.32 ^a	42.10 ± 0.32 ^{a,b}	0.0001
	49	48.44 ± 0.36 ^b	47.95 ± 0.38 ^b	45.57 ± 0.44 ^a	44.85 ± 0.44 ^a	0.0001
	56	64.05 ± 0.48 ^b	64.54 ± 0.46 ^b	61.49 ± 0.516 ^a	60.46 ± 0.45 ^a	0.0001
	Mean	38.98 ± 0.22 ^b	38.91 ± 0.24 ^b	37.24 ± 0.23 ^a	37.20 ± 0.22 ^a	0.0001

P < 0.05.

Abbreviations: FM, Fiji Mouse; FDP, Fiji Digitizing Pen; IP, Image Pro Plus 10; CytoF, cytoinformatics; CSA, cross sectional area; MFD, Minimal Feret's Diameter.

^{a-c}Comparisons are made within row regarding fiber parameters between different software of segmentation using superscript letters.

As shown in [Table 1](#), x20 magnification (950 ± 70.5) showed the greater number of fibers detected at age of hatching (day 0), followed by x25 (902 ± 61.0), then by Slide Scanner (796 ± 65.0). Moreover, the magnification x10 has superior detection of the number of fibers compared with the Slide Scanner at D7 (837 ± 56.4 vs. 626 ± 44.8) and D14 (839 ± 112.0 vs. 623 ± 65.7), and for this latter it was impossible to identify the number of fibers at the age of hatching. There was no significant difference between magnification x20 and x25 at different stages of age. It can be seen that x40 magnification showed the lowest detection of the number of fibers at different age categories.

Time Required for Segmentation Comparison Between the 3 Softwares (CytoF, Fiji "FDP, FM", and IP)

Time needed for segmentation of the 9 selected images was not provided by the CytoF group because they segmented all the images of our project. Time was expressed in hours, minutes, and seconds (hour: minute: second). To achieve a complete segmentation, two steps were conducted in order to enhance the quality of the final image by cell separation and artefacts deletion.

First Step of Segmentation (Fiber Individualization). There was a significant effect of

software type on time required for post processing ($P < 0.021$, Table 2). As indicated in Table 2, there was a difference in time estimated for fiber individualization between IP and FDP. Furthermore, IP (mean time, 1:18:06) showed the lowest time of segmentation at consecutive stages of age, followed by FM (mean time, 2:39:05) and finally the longest time required was observed in FDP (mean time, 3:02:46). According to Figure 6, we can see that the time required for fiber individualization decreases with age until 28 days, where there is a slight increase from 35 to 42 days.

Second Step of Segmentation (Post Processing of Segmented Images). The 9 images segmented by IP were rechecked by Fiji to remove irrelevant tissue, artefacts and nonsegmented cells that took more time. There was a significant effect of software type on time required for post processing ($P < 0.0009$, Table 2). As shown in Table 2, there was a difference in time estimated for post processing between IP and CytoF and FDP. Moreover, CytoF has the lowest time required for post processing (mean time, 0:10:00) and IP the highest (mean time, 0:40:31). From the Figure 7, we can note that the time required for the post-processing of segmented images decrease with age until 28 days, where there is an increase from 35 to 42 days.

Comparison of Muscle Fiber Parameters Obtained After Segmentation With the 3 Softwares

Total Number of Fibers in Muscle. The total number of muscle fibers calculated after segmentation was approximately equal at different age categories using the 3 softwares ($P < 0.999$, Table 2). The mean number of fibers in all stages of age was respectively, 612, 614, 613, and 623 for FM, FDP, IP, and CytoF (difference did not exceed 11 fibers).

CSA. There is a significant difference between the 3 software in CSA at different ages ($P < 0.0001$, Table 3), only at 42 days of age, no effect of software type was observed ($P < 0.349$, Table 3). Moreover, IP has more significant differences at different categories of age and the lowest value of mean CSA compared to other software (1743.16 ± 17.82 , Table 3). The results obtained from Table 3 analysis demonstrate that FM and FDP showed the highest values of mean CSA (1863.61 ± 19.44 and 1869.47 ± 18.57 , respectively) followed by CytoF (1833.77 ± 18.92). These later showed no difference in comparison.

Perimeter. Results showed a significant difference between the 3 softwares in perimeter at different stages of age ($P < 0.0001$, Table 3).

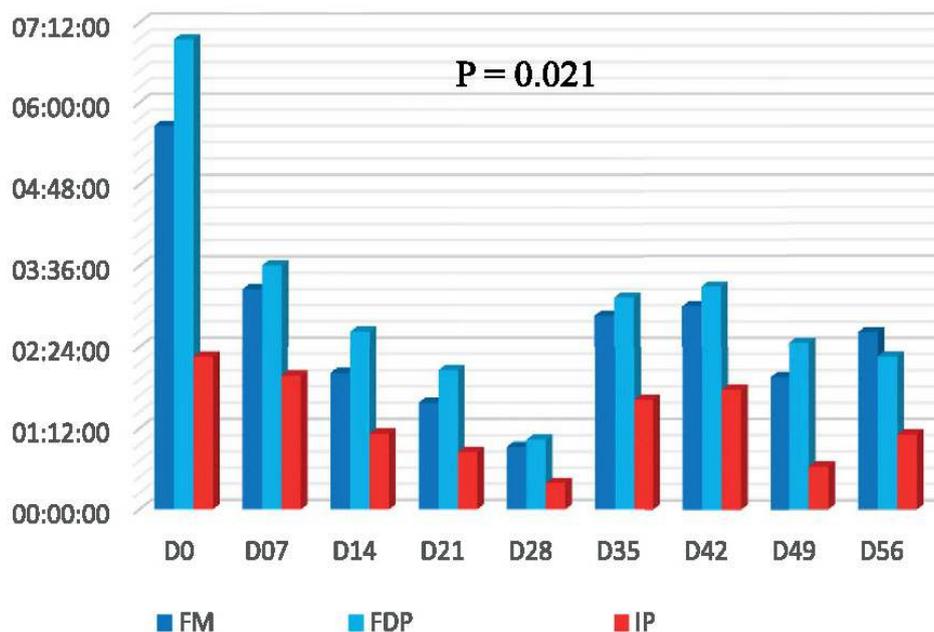


Figure 6. Time required (h: min: s) for first step of segmentation (fiber individualization) in function of age using two software (Fiji "Fiji/DP, Fiji/M" and IP).

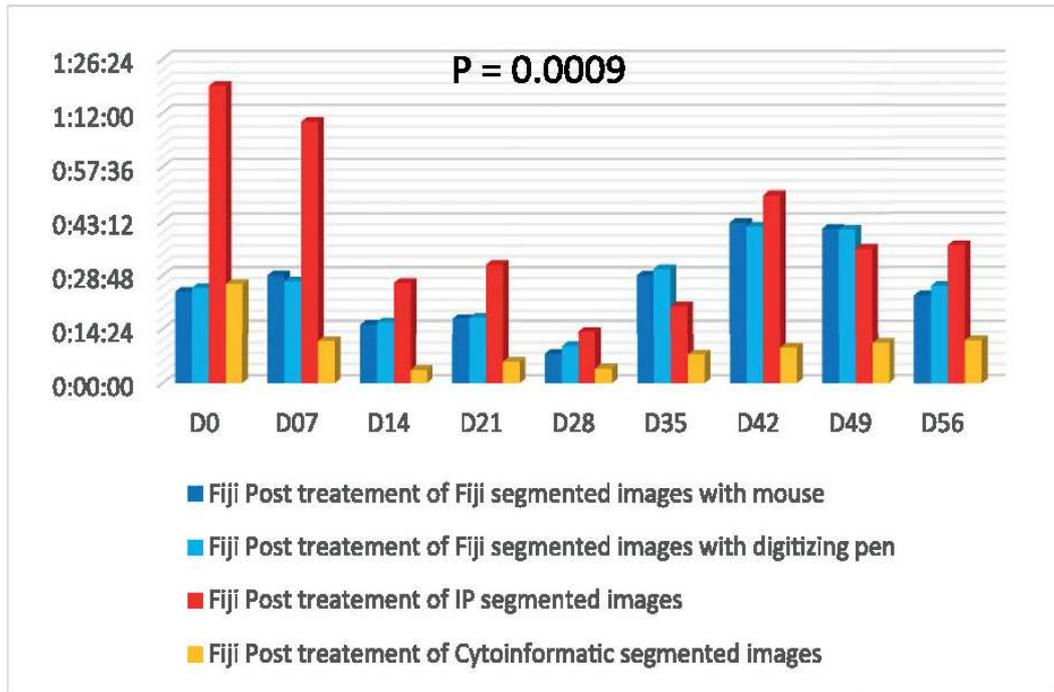


Figure 7. Time required (h: min: s) for second step of segmentation (Post Processing) in function of age using 3 softwares (Fiji "FDP, FM", CytoF, and IP).

Irrespective of age, a closer inspection of the [Table 3](#) shows that significant differences were mostly observed between FM and FDP, and IP. As [Table 3](#) shows, there is no significant difference between FM and FDP and they detected the highest Mean values of perimeter (171.83 ± 1.04 and 171.84 ± 0.99 , respectively) followed by CytoF (166.01 ± 0.99). In addition, IP showed the lowest Mean value of perimeter with more difference compared to other software (159.45 ± 0.93).

MFD. The results showed a significant difference in MFD between the 3 software in function of age ($P < 0.0001$, [Table 3](#)). The results obtained from [Table 3](#) analysis demonstrate that FM and FDP showed the highest Mean values of MFD with no difference in comparison (38.91 ± 0.24 and 38.98 ± 0.22 , respectively). Moreover, IP and CytoF showed the lowest values of MFD with no difference in comparison (37.20 ± 0.22 and 37.24 ± 0.23 , respectively).

DISCUSSION

The study of muscle biology is based on physiological (metabolic or contractile type) and morphological determinism (number, CSA, MFD, and perimeter). Processed image

recorded from histology and histoenzimology sections of muscle, are the best methods to explore these determinisms. The study present describe the steps of muscle image processing, which are consecutively, image acquisition, segmentation (morphometries determination), and fiber typology (contractile type determination).

Image Acquisition

It might be appropriate for good research on muscles to work with a number greater than 400 fibers ([Garton et al., 2010](#)). In the current study, this number is reached by using x200 magnification with at least 2 fields for each type of coloration. The number of fields increases with age, the latter was respectively, 2 at the post hatching, D7 and D14, 3 fields at D21, 4 fields at D28, more than 6 fields at D35, J42, J49, and J56, which inevitably require more time for taking the serial images. This problem forced researchers to minimize the number of fields as well as the number of fibers to be analyzed ([Kim et al., 2007](#); [Liu et al. 2013](#)); or to use different magnifications in the same study with high magnifications for muscles of early ages and low magnifications for muscles of adults ([Remignon, 1993](#)). The

latter author conducted a study on muscles of developing chicken from D0 post hatching until the age of 55 weeks and analyzed an average of 400 fibers in 2 microscopic fields with different magnifications (x45, x90, and x215). However, most researches have not specified the magnification used and / or the number of fibers analyzed (Karen et al., 2009; Meng et al., 2014; Dale Zotte et al., 2015; Sapkota et al., 2015; Wang., 2016). In our study, the average number of fibers by image at the early ages, D0, D7, and D14 post hatching is 950, 227, and 253, respectively, which is considered as acceptable. However, the segmentation of these images was very difficult because of the small size of the fibers and despite the acceptable resolution of the camera (18 MP). Similarly, the very same observations were produced using the magnification x250. The images of x100 magnification are more adequate regarding the average number of fibers / image, which exceeds 400 fibers at D7, J14, J21 and J28, and 200 fibers at D35, J42, J49, and J56. Although, the segmentation was very difficult especially at the early ages D7, D 14, and D21, where the images became blurred when the zoom was applied to recognize the boundaries of the cells. In addition, it is impossible to work on images using this magnification at D0 post-hatching. The magnification of x400 is more laborious due to the number of fields that exceeds 6 for each muscle studied from the day 7 post-hatching.

The average number of fibers / image in all the ages studied varies between 600 and 1000 using CytoF, which is considered very acceptable. The software used by the group CytoF, which can work on images in SVS format, is related to this acceptable fiber determination. In addition, the capacity of segmentation of this later covers the whole virtual section but more expensive.

Time Required for Segmentation Comparison Between the 3 Softwares (CytoF, Fiji “FDP, FM” and IP)

Image analysis algorithms are widely used by biomedical researchers and software engineers. To carry out this part of the work, first, we selected 2 semi-automatic softwares which are ImageJ (Fiji) from NIH and IP, from Media

Cybernetics since these two software are the most popular currently according to Kostraminova et al. (2013) and their popularity in research fields is associated to several factors such as, accuracy of results, accessibility (price and availability). Secondly, we worked with the Cytoinformatics LLC group for segmentation with automatic software. The comparison between the 3 softwares was conducted based on:

The Time Required for Segmentation and the Number of Fibers Obtained. The observation of the time of segmentation of the nine images by the 3 softwares reveals that this time decreases with age but it is fluctuating from one image to another and that could be explained:

Firstly, by the degree of automatism of the tool used for segmentation:

The total time required for segmentation (in hours: minutes: seconds) of the nine images using FM is 26: 23:37 and their average segmentation time is 02: 56: 25. Hence, in our work carried out on four muscles with 10 repetitions for nine ages studied, we needed 1061.6 hours to complete this segmentation, which is the equivalent of 44.33 days of non-stop work or almost 353.23 days with 8 hours of work per day (Figure 6).

Moreover, segmenting these images with FDP showed the highest time (27: 24: 56) compared to the other segmentation methods; therefore, the average time for each image segmentation is 3: 05: 00, but FDP remains the accurate tool for measuring the fiber parameters.

The total time required for the segmentation of these same nine images by IP is 10:21:35 and their average segmentation time is 1:13:06; so for our work it took 438.6 hours which is the equivalent of 18.27 days of non-stop work or almost 146.2 days with 8 hours of work (Figure 6).

On the other hand, the new image processing algorithms can manage an automatic segmentation of the image in less than a minute (Liu et al., 2013, Cui et al., 2019) even if these images have a large scale that can reach up to 9000×9000 (Cui et al., 2019) which considerably reduces the average image processing time.

Secondly, this time is also influenced by the number of fibers / image which is linked to several factors such as:

Age: The number of fibers / image decreases progressively with age due to the radial growth of the fiber and therefore the segmentation time is negatively correlated with age.

The shape and size of the fiber: the irregular and overlapping shape as well as the small size of the fiber increase the segmentation time; these same findings are observed by [Liu et al. \(2013\)](#), and [Wang \(2016\)](#).

The percentage of connective tissue: when the connective tissue is abundant in the image, the number of fibers and that of overlapped ones decrease, which reduces the time of segmentation. The percentage of connective tissue varies within the same muscle and from one muscle to another; it has the decreasing value of the slow → intermediate → rapid, according to our unpublished work. As an example, the images chosen at ages D21 and D28 that contain a lot of connective tissue and the number did not exceed 420 fibers, presented a segmentation time lower than the other images ([Figure 6](#) and [Table 2](#)).

Finally, by the image quality: the well-colored image with good resolution and less debris and artefacts has a low segmentation time.

The Time Required for Post Processing of Segmented Images. The performance of image processing software for muscle tissue is linked to its ability to remove artefacts, irrelevant tissue and to separate any contact between the fibers. The average time (in hour: minute: second) of the post processing of the nine images segmented by FDP and FM was around 00: 25: 00 ([Figure 7](#)) and therefore a total time for the post processing of all the images of our work which is around 112: 50: 00.

The average time of post processing of the nine images segmented by CytoF which was carried out by Fiji is 0: 10: 16h ([Figure 7](#)) and therefore a total average time for the post-processing of all the images of our work that is estimated at 45: 72: 00h. The post-processing time of the segmented images by CytoF is very low because these images do not contain artefacts and irrelevant tissues and this time is intended only for the segmentation of the touching fibers. In addition, the average time of the post-processing of these same images by Image Pro Plus 10 (IP) is the highest compared to the previous

software with a time of 00: 32: 06 h ([Figure 7](#)). Therefore, a total time which is by means of 144: 45: 00 h, this is due of the presence of many artefacts and irrelevant tissues in the images segmented with this software ([Figure 8](#)).

Comparison of Muscle Fiber Parameters Obtained After Segmentation With the 3 Softwares

The 3 segmentation methods FDP, FM, and CytoF gave consistent results for CSA, but with non-significant differences, this latter is less than 3.34% for CytoF compared to FDP ([Table 3](#)). This parameter (the Area) which is the main criterion for studying muscle fiber confirms that the measurements obtained by CytoF concerning CSA are closer to the measurements obtained by manual segmentation performed by FDP and FM. No significant difference between FDP and FM.

However, statistically, there are highly significant differences for the Perimeter and DMF between CytoF and FDP but the differences are not significant ([Table 3](#)) with fairly encouraging percentages for these two parameters calculated by the CytoF (less than 5.06% and 5.01% for the Perimeter and DMF respectively) compared to those calculated by FDP.

According to [Kostraminova et al. \(2013\)](#), Image J (Fiji) and IP are widely accepted for precise measurements of CSA. The highly significant difference between FDP and IP regarding the average area of the fiber is related to the

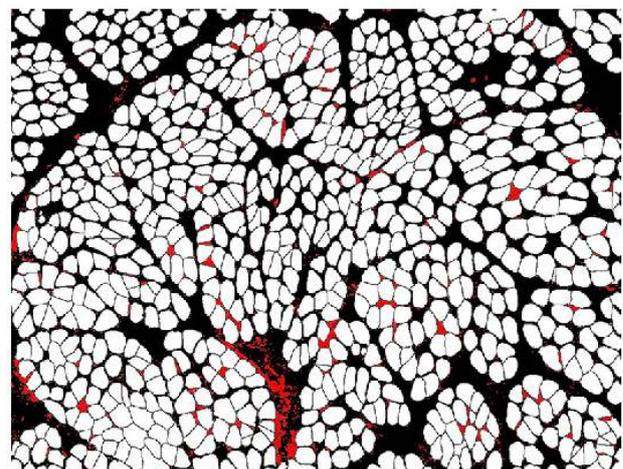


Figure 8. Image of the Anterior Latissimus Dorsi muscle of a 42-day-old chicken segmented by IP shows (in red) artefacts and irrelevant tissue.

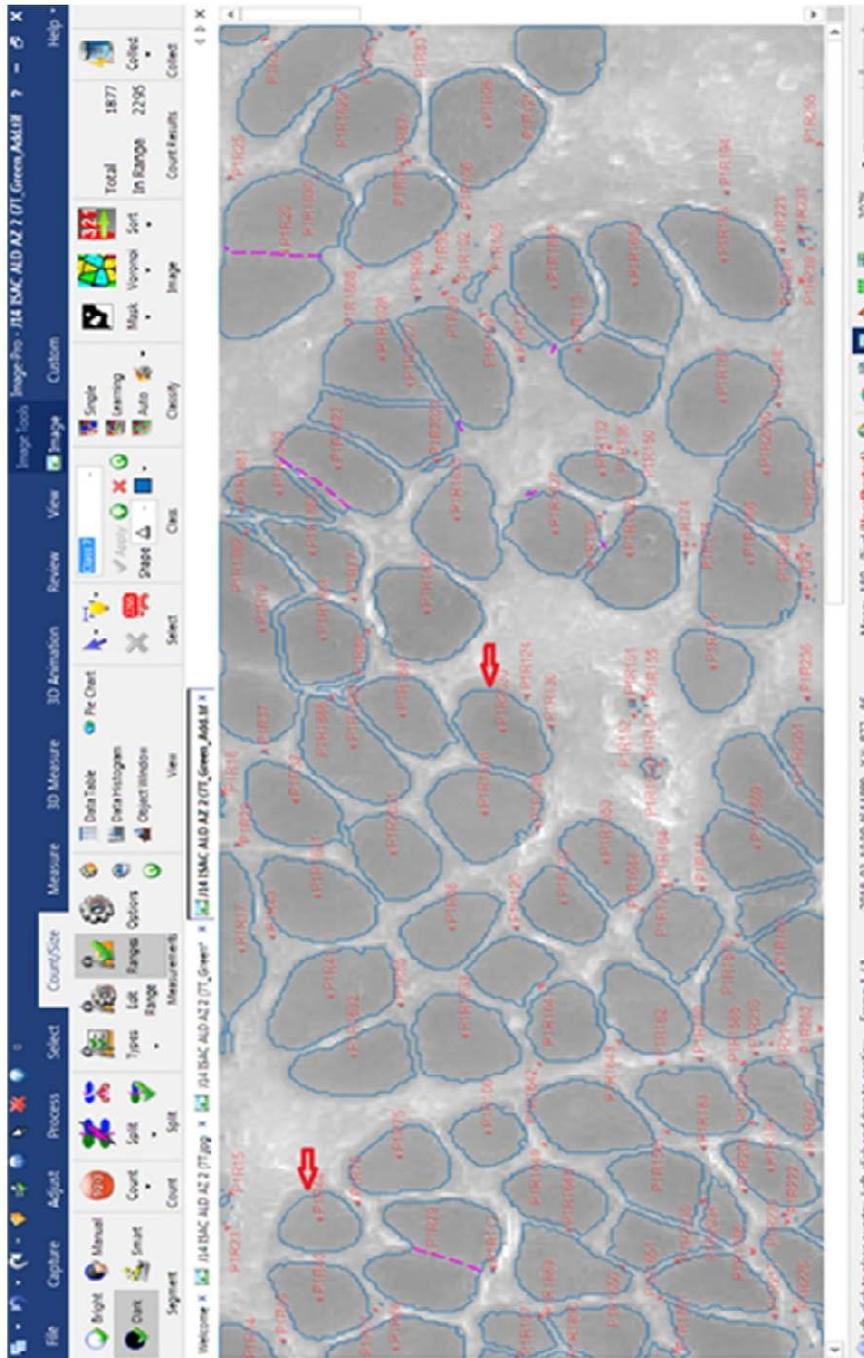


Figure 9. Image segmented by IP, the red arrows indicate small margins forming part of the fibers and which are neglected during the segmentation by the software.

thresholding step of IP, which leaves a small margin in some cases (Figure 9). This influences the calculation of the average value which is less than 5.02% compared to that calculated by FDP and which remains very satisfactory.

The highly significant differences between FDP and IP concerning the perimeter and MFD are associated with fiber Area calculation (less Area = less perimeter and less MFD). The MFD is very resistant against experimental errors such as the orientation of the angle of section (Liu et al., 2013), and it is recommended by Rüegg and Meinen, 2014. However, it is influenced by the segmentation technique because it measures the minor diameter in the muscle cell (Meng et al., 2014). Despite this, the average values calculated by IP of these two parameters (Perimeter and MFD) are also acceptable; they are respectively less than 7.19% and 3.96% compared to those found by FDP.

Semi-automatic tools (Fiji and IP), always require prior processing, where the operator must interact manually with the computer, using a digitizing pen or a computer mouse, to remove artefacts and irrelevant tissues and trace the contours of non-segmented muscle fibers. This interaction makes the analysis of a large number of images more laborious and impractical, these observations are confirmed by some authors (Mayachitra, 2006; Janssens et al., 2013; Cui et al., 2019); despite that, this software remains in use by a large community of researchers.

As regards the automatic tools and despite their paid services and limited availability (in addition to the criticisms addressed about many of these programs such as the use of shortcuts, assuming for example that the fibers are circles or ellipses). Therefore, the measurements of the morphological parameters of the fibers can be inaccurate (Meng et al., 2014); the software of the CytoF remains free of these criticisms and gives satisfactory results.

Fiber Typology

We adopted the manual method for typing muscle fibers for 2 reasons; the first is the additional costs and the second is the difficulties of classifying all muscle cells. Moreover, sections where the muscle fibers are not parallel to each

other or they change shape through a large series of sections, or disappear or divide from the section are well presented in our work and proved by Karen et al. (2009).

CONCLUSIONS AND APPLICATIONS

1. Slide Scanner allows a large-scale selection of image with a good resolution and a satisfactory number of muscle cells per image compared to images captured with different magnifications commonly used in research.
2. Research work on muscle tissue with Scanner image will gradually replace the conventional images of the microscope.
3. The progress in automation of image acquisition and processing helps researchers to reduce the amount of time required for image processing from hours to minutes or seconds and save more time for other steps of their research.
4. CytoF in the field of muscle cell segmentation provides a very satisfactory and more precise service. However, the remaining concern is that the segmentation not performed by the researcher himself, which requires a post-image processing step to remove any contact between cells using another tool.
5. The free access advantage of Fiji makes it ideal for researchers and small laboratories with limited resources. However, Fiji software is universal, and as such, has a menu that contains numerous functions with a complex graphical interface that requires a good amount of training. It is recommended to create a special free version of muscular images treatment with only specific tools to this field and a full documentation for users.
6. IP is simpler and easier and makes the processing of muscle tissue images faster if compared with Fiji, but it requires a good mastery of its tools for satisfactory results.

ACKNOWLEDGMENTS

We deeply would like to acknowledge Christophe Praud and Cecile Berri (Unité de Recherche Avicole-INRA France) for their help

in the mastery of different staining of muscle tissue. We also thank Anthony Sinadinos (School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Portsmouth, UK) for offering us the Macro (Muscle Morphometry).

No funding was received.

H. B. and A. Ac participated in image analysis. A. Az. analyzed data. A. Ac. and A. Az. wrote the manuscript. M. M. supervised the findings of this work. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis and manuscript.

DISCLOSURES

The authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Algeria. 1995. National Executive Decree. No. 95-363 of November 11. Algeria. Accessed Jan. 2019. <http://faolex.fao.org/docs/pdf/alg46224.pdf>.
- Buche, P., and D. Mauron. 1997. Quantitative characterization of muscle fiber by image analysis. *Comput. Electron. Agriculture*. 16:189–217.
- Bye, E., O. Gronnerod, and N. B. Vogt. 1989. Multivariate classification of histochemically stained human skeletal muscle fibres by the SIMCA method. *Histochem. J.* 21:15–22.
- Cui, L., J. Feng, and L. Yang. 2019. Towards fine whole-slide skeletal muscle image segmentation through deep hierarchically connected networks. *J. Healthc Eng.* v. 2019:1–10.
- Dalle Zotte, A., S. Z. Metzger, H. Remignon, and Z. S. Szendro. 2015. Etude morphométrique et histochemique des fibres musculaires des lapereaux issus de mères nourries avec un aliment supplémenté en lysine. Pages 151–154 in *Proc. 11èmes J. Rech. Cunicoles Fr, Paris*. INRA, ed. ITAVI, Paris, France.
- Desgeorges, T., S. Liot, S. Lyon, J. Bouvière, A. Kemmel, A. Trignol, and G. Juban. 2019. Open-CSAM, a new tool for semi-automated analysis of myofiber cross-sectional area in regenerating adult skeletal muscle. *Skeletal Muscle*. 9:1–12.
- Dryden, I., R. Farnooosh, and C. Taylor. 2006. Image segmentation using voronoi polygons and mcmc, with application to muscle fibre images. *J. Appl. Statist.* 33:609–622.
- Eržen, I., and V. Maravić. 1993. Simultaneous histochemical demonstration of capillaries and muscle fibre types. *Histochemistry*. 99:57–60.
- Garton, F., J. T. Seto, N. K. North, and N. Yang. 2010. Validation of an automated computational method for skeletal muscle fibremorphometry analysis. *Neuromuscul. Disord.* 20:540–547.
- Henckel, P. 1989. Image analysis, a rapid method to determine histochemical properties of skeletal muscles including individual types. *Proc. 40th annual meeting of the European Association for Animal Production*. Dublin, Ireland, EAAP, Rome, Italy.
- Janssens, T., L. Antanas, S. Derde, I. Vanhorebeek, G. Van den Berghe, and F. G. Grandasa. 2013. CHARISMA: An integrated approach to automatic H&E-stained skeletal muscle cell segmentation using supervised learning and novel robust clump splitting. *Med. Image Anal.* 17:1206–1219.
- Karen, P., M.Š. Števanec, V. Smerdu, E. Cvetko, L. Kubínová, and I. Eržžen. 2009. Software for muscle fibre type classification and analysis. *Eur J Histochem.* 53:87–95.
- Kim, Y., T. Brox, W. Feiden, and J. Weickert. 2007. Fully automated segmentation and morphometrical analysis of muscle fiber images. *Cytometry A*. 71:8–15.
- Klemencic, A., S. Kovacic, and F. Pernus. 1998. Automated segmentation of muscle fiber images using active contour models. *Cytometry A*. 32:317–326.
- Kostrominova, T. Y., D. S. Reiner, R. H. Haas, R. Ingermanson, and P. M. Mc Donough. 2013. Automated methods for the analysis of skeletal muscle fiber size and metabolic type. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 306:275–332.
- Liu, F., A. L. Mackey, R. Srikuea, K. A. Esser, and L. Yang. 2013. Automated image segmentation of haematoxylin and eosin stained skeletal muscle cross-sections. *J. Microsc.* 252:275–285.
- Mayachitra, I. 2006. Bring State-of-Art Image Informatics Solutions to Your Desktop. Accessed Jan. 2019. https://mayachitra.com/wp-content/uploads/2017/03/Mayachitra_Brochure_Web.pdf.
- Mayeuf-Louchart, A., D. Hardy, Q. Thorel, P. Roux, L. Gueniot, D. Briand, A. Mazeraud, A. Bouglé, S. L. Shorte, B. Staels, F. Chrétien, H. Duez, and A. Danckaert. 2018. MuscleJ: a high-content analysis method to study skeletal muscle with a new Fiji tool. *Skeletal Muscle*. 8:25.
- Meng, H., P. M. Janssen, R. W. Grange, L. Yang, A. H. Beggs, L. C. Swanson, S. C. Cossette, A. Frase, M. K. Childers, H. Granzier, E. Gussoni, and M. W. Lawlor. 2014. Tissue triage and freezing for models of skeletal muscle disease. *J. Vis. Exp.* 89:2–8.
- Meunier, B., R. Labas, B. Picard, and T. Astruc. 2010. Typage des fibres musculaires bovines sur coupes immunohistologiques par une méthode innovante d'analyse d'images. Pages 243–244 in *Proc. 13èmes Journées "Sciences du Muscle et Technologie des Viandes," JSMTV, Clermont-Ferrand, France*.
- Mula, J., J. D. Lee, F. Liu, L. Yang, and C. A. Peterson. 2013. Automated image analysis of skeletal muscle fiber cross-sectional area. *J. Appl. Physiol.* 114:148–155.
- Pernuš, F., and I. Eržžen. 1991. Arrangement of fiber types within fascicles of human vastus lateralis muscle. *Muscle Nerve*. 14:304–309.
- Remignon, H. 1993. Contribution à l'étude histologique et biochimique des muscles dans deux lignées de poulets à croissance lente et rapide. (Thèse). Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Rüegg, M. A., and S. Meinen. 2014. Quantitative Determination of Minimal Feret's Diameter, Including the Evaluation of the Percentage of Centralized Nuclei, Fiber Numbers, Cross-Sectional Area and the Percentage of

- Fibrosis. Treat-NMD Neuromuscular Network, CURE CMD Congenital muscular Dystrophy MDC1A_M.1.2.002 1.0 April 19th, 2011 January 28th. Accessed June 2021. http://www.treat-nmd.eu/downloads/file/sops/cmd/MDC1A_M.1.2.002.pdf.
- Sapkota, M., F. Xing, F. Liu, and L. Yang. 2015. Skeletal muscle cell segmentation using distributed convolutional neural network. Proc. 8th International Workshop on High Performance Computing for Biomedical Image Analysis (HPC-MICCAI), Munich, Germany.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*. 9:671–675.
- Sertel, O., B. Dogdas, C. S. Chiu, and M. N. Gurcan. 2011. Microscopic image analysis for quantitative characterization of muscle fiber type composition. *Comp. Med. Imag. and Graph.* 35:616–628.
- Sifre, L., B. André, and J. Coton. 2009. Development of a system to quantify muscle fiber destruction. *Meat Sci.* 81:515–522.
- Strange, H., I. Scott, and R. Zwiiggelaar. 2014. Myofibre segmentation in H&E stained adult skeletal muscle images using coherence-enhancing diffusion filtering. *BMC Med Imaging.* 14:38.
- Wang, Z. 2016. A semi-automatic method for robust and efficient identification of neighboring muscle cells. *Pattern Recognit.* 53:300–312.
- Wen, Y., K. A. Murach, I. J. Vechetti, C. S. Fry, C. Vickery, C. A. Peterson, J. J. McCarthy, and K. S. Campbell. 2018. Myo vision: software for automated high-content analysis of skeletal muscle immunohistochemistry. *J. Appl. Physiol.* 124:40–51.
- Wiesmann, V., D. Franz, C. Held, C. Munzenmayer, R. Palmisano, and T. Wittenberg. 2014. Review of free software tools for image analysis of fluorescence cell micrographs. *J. Microsc.* 257:39–53.

RÉSUMÉ

Résumé

Cette étude a porté sur les paramètres morphométriques, histologique et histochimiques des fibres musculaires des poulets de chair tout en profitant des progrès technologiques récents dans le traitement et l'analyse d'images numériques.

Les résultats de la présente étude montrent que le nombre de fibre musculaire diminue progressivement avec l'âge des poulets. Le muscle Sart n'est pas composé de deux parties mixte et rapide, mais réellement il a une variabilité de distribution intra musculaire des fibres (les fibres lentes I et IIA diminuent de la partie médiale à la partie latérale, tandis que les fibres IIB augmentent de la partie médiale vers la partie latérale). De même que le muscle ALD présente une variabilité de distribution intra musculaire, les fibres IIIA sont bien dispersées sur toute la surface du muscle, alors que les fibres IIIB étaient bien dispersées sur la surface du muscle pour diminuer progressivement après dans la partie caudale. Les fibres IIA sont rares au début de croissance pour augmenter après dans les derniers âges surtout dans les parties crâniale, médiocrâniale et caudale du muscle. L'utilisation des logiciels de traitement et d'analyse d'images révèlent des résultats très intéressants. Nos résultats révèlent que les études histologiques limitées l'observation d'un champ limité de fibres ne reflètent pas l'aspect histologique réel du muscle en raison des variations inter/intra musculaires existantes entre l'ensemble des muscles d'un être vivant. Donc les études histo-enzymologiques approfondies sur l'ensemble des surfaces des muscles seraient très indispensables pour juger l'aspect normal d'un muscle en excluant une suspicion d'une pathologie musculaire ou pour voir sa corrélation avec la qualité de la viande.

Mots clés : poulet de chair, fibres musculaires, histo-enzymologie, acquisition d'image, segmentation, calcul des paramètres morphométriques, typage des fibres musculaires.

المخلص

ركزت هذه الدراسة على المعلومات المظهرية □ النسيجية □ الكيمائية لألياف العضلات عند الدجاج اللحم مع الاستفادة من التطورات التكنولوجية الحديثة في معالجة الصور الرقمية □ تحليلها .

بينت نتائج الدراسة الحالية أن عدد ألياف العضلات يتناقص تدريجياً مع تقدم عمر الدجاج. لا تتكون عضلة Sart من جزأين مختلط □ سريع، لكن في الحقيقة لديها تباين في التوزيع العضلي للألياف (الألياف البطيئة □ I IIA تنخفض من الجزء الداخلي إلى الجزء الخارجي، بينما تزداد ألياف IIB من الجزء الداخلي إلى الجزء الخارجي). كذلك اظهرت عضلة ALD تباين في التوزيع العضلي، كانت ألياف IIIA منتشرة جيداً على كامل سطح العضلات، بينما كانت ألياف IIIB منتشرة جيداً على سطح العضلة لتتخفف تدريجياً بعد ذلك في الجزء الذليل. تكون ألياف IIA نادرة في بداية النمو ثم يزداد لاحقاً مع تقدم العمر خاصة في الأجزاء القحفية، الداخلية القحفية، الذيلية من العضلات. كشف استخدام برامج معالجة الصور □ تحليلها عن نتائج مثيرة للاهتمام للغاية.

كشفت نتائج الدراسة أن الدراسات النسيجية التي تعتمد ملاحظة مجال محد □ د من الألياف لا تعكس المظهر النسيجي الحقيقي للعضلة بسبب الاختلافات العضلية الموجودة بين □ داخل كل عضلات الكائن الحي. لذا فإن الدراسات الأنزيمية النسيجية المتعمقة على جميع مساحات العضلات ستكون ضرورية للغاية للحكم على المظهر الحقيقي للعضلة □ اقصاء أي شك لمرض العضلات □ معرفة ارتباطها بجودة اللحم. الكلمات الدالة: دجاج التسمين، الألياف العضلية، علم الانسجة □ الانزيمات، الحصول على الصور، التجزئة، حساب قياسات الألياف العضلية، تحديد أنواع الألياف العضلية.

Summary

This study focused on the morphometric, histological and histochemical parameters of broiler muscle fibers, while taking advantage of recent technological advances in digital image processing and analysis.

The results of the present study show that the number of muscle fibers gradually decreases with the age of chickens. The Sart muscle is not composed of two parts mixed and fast, but really it has a variability of intramuscular distribution of fibers (slow fibers I and IIA decrease from the medial part to the lateral part, while IIB fibers increase from the medial part to the lateral part). Just as the ALD muscle has a variability of intramuscular distribution, the IIIA fibers are well dispersed over the entire surface of the muscle, while IIIB fibers were well dispersed on the surface of the muscle to gradually decrease thereafter in the caudal part. IIA fibers are occasional at the beginning of growth to increase later in the last ages especially in the cranial, mediocranal and caudal parts of the muscle. The use of image processing and analysis software reveals very interesting results. Our results reveal that histological studies with observation of limited field of fibers do not reflect the actual histological appearance of the muscle because of the existing of inter/intra muscle variations between all the muscles of a living being. So in-depth histo-enzymological studies on all muscle surfaces would be very essential to judge the real appearance of a muscle excluding a suspicion of a muscular pathology or to see its correlation with the quality of meat.

Keywords : broilers, muscle fiber, histo-enzymology, image acquisition, segmentation, calculation of muscle fiber morphometric parameters, fiber typing.