

ANALYSE HISTOLOGIQUE DE LA TAILLE DE FIBRES MUSCULAIRES DE POISSON

BUGEON Jérôme, BRANTHONNE Adèle, GABILLARD Jean-Charles,
LEFEVRE Florence

*Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons,
INRAE Campus de Beaulieu
35000 Rennes - France*

Auteur correspondant : jerome.bugeon@inrae.fr

HISTOLOGICAL ANALYSIS OF FISH MUSCLE FIBER SIZE

ABSTRACT

Skeletal muscle growth in large fish such as trout involves both hypertrophy (increase in size) and hyperplasia (increase in number) of muscle fibers over a large part of their life cycle. Characterizing and quantifying these mechanisms require cross-sections of muscle to identify muscle fibers and measure their individual areas and diameters. Consequently, we need tools that can perform these analyses on a large number of fibers (800 to 1000) and on many animals. Image analysis automation of these measurements relies on histological images with sufficient contrast between the different tissues present in the muscle (connective tissue, adipose tissue and muscle fibers). Thus, using paraffin sections, we have used topographical stains such as Sirius Red alone or combined with "Fast" Green, or fluorescent markers such as wheat germ agglutinin combined with Alexa fluor™. These markers stain the muscle fibers extracellular matrix, enabling their surface area to be measured. These analyses have been used in various research programs and have allowed to show the effects of breeding factors such as swimming activity or the genetic origin of the animals on muscle growth. We have also been able to show the relationships between muscle fiber size or number and quality parameters such as fillet yield or mechanical strength of the flesh. Today, the use of artificial intelligence methods facilitates analysis by allowing more precise automatic detection of muscle fibers.

KEY WORDS

Artificial intelligence, Fish, Image analysis, Muscle fiber.

RÉSUMÉ

La croissance du muscle squelettique chez les poissons de grande taille comme la truite procède à la fois par un mécanisme d'hypertrophie (augmentation de la taille) et d'hyperplasie (augmentation du nombre) des fibres musculaires pendant une grande partie de leur cycle de vie. La caractérisation et la quantification de ces évolutions structurales nécessitent de réaliser des coupes de muscle afin d'identifier les fibres musculaires et de mesurer leurs surfaces et diamètres en coupes transversales. Pour cela, il est nécessaire de disposer d'outils permettant de faire ces analyses sur un grand nombre de fibres (800 à 1000) et sur de nombreux animaux. L'automatisation informatisée de ces mesures repose sur l'obtention d'images histologiques qui présentent un contraste suffisant entre les différents composants présents au sein du muscle (tissu conjonctif, adipeux et fibres musculaires). Ainsi, à partir d'échantillons inclus en paraffine, nous avons mis en œuvre des colorations histologiques comme celle du Rouge Sirius seul ou associé au Vert « Rapide » ou des marqueurs fluorescents comme l'agglutinine de germe de blé associée à des Alexa fluor™. Ces deux types de marquage permettent notamment de mettre en évidence le contour des fibres musculaires en vue de mesurer leur surface en coupe transversale. Ces analyses ont été utilisées dans différents programmes de recherche et nous ont permis de montrer les effets de facteurs d'élevage comme l'activité de nage ou l'origine génétique des animaux sur la croissance musculaire. Nous avons également pu montrer les relations entre la taille ou le nombre des fibres musculaires et des paramètres de qualité comme le rendement en filet ou la résistance mécanique de la chair. Ces dernières années, l'utilisation des méthodes d'intelligence artificielle ont facilité l'analyse en permettant une détection automatique plus précise des fibres musculaires.

MOTS CLÉS

Analyse d'image, Fibre musculaire, Intelligence artificielle, Poisson.

INTRODUCTION

L'aquaculture permet de contrôler les conditions d'élevage des poissons et ainsi de maîtriser leur croissance et la qualité des produits. Celle-ci est en partie liée à la composition et la structure du muscle squelettique axial (filet) et de l'ensemble des tissus qui le compose (fibres musculaires, tissus adipeux et conjonctif) [1]. Chez les poissons de grande taille, tels que la truite, la croissance des fibres musculaires repose sur deux mécanismes distincts : l'hypertrophie, correspondant à l'augmentation de la taille des fibres, et l'hyperplasie, qui se traduit par une augmentation du nombre de fibres. Contrairement à la majorité des autres vertébrés, chez lesquels l'hyperplasie cesse autour de la naissance, ces mécanismes perdurent durant une grande partie du cycle de vie des poissons, faisant de ces espèces un modèle d'étude original. L'étude de ces processus nécessite une quantification précise du nombre et du diamètre des fibres musculaires. Pour ce faire, l'histologie est une technique de choix puisqu'il est possible de réaliser des coupes transversales de muscle, d'identifier les fibres musculaires et de mesurer leur surface et leur diamètre. Il est ainsi nécessaire de disposer de techniques de coloration permettant de bien discerner les cellules et tissus présents au sein d'un muscle (fibres musculaires, tissus adipeux et conjonctifs), mais également de méthodes de traitements d'images performantes pour analyser un grand nombre de fibres de façon automatisée.

Nous présentons dans cet article les différentes méthodes de coloration utilisées et leurs évolutions avec l'émergence d'outils de traitements d'images de plus en plus performants depuis l'arrivée d'algorithme d'Intelligence Artificielle (IA) dédiés à la segmentation des cellules. Nous illustrerons ensuite avec quelques exemples de résultats obtenus dans différents programmes de recherche comment ces techniques ont permis de faire avancer nos connaissances sur l'impact des facteurs d'élevage sur la croissance du muscle et sa possible relation avec la qualité des produits.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les échantillons de muscle de truite utilisés ont été obtenus au sein des installations expérimentales INRAE PEIMA, structure autorisée pour l'expérimentation animale en vertu du règlement français D29-277-02.

Les échantillons de muscle squelettique blanc (bloc de 10 x 10 x 5 mm) sont prélevés soit à l'aplomb de la nageoire dorsale (**Figure 1**), soit au niveau de la nageoire anale, puis fixés (de 48 h à 96 h à 4 °C) dans une solution de Carnoy (mélange d'éthanol absolu, de chloroforme, et d'acide acétique 6 : 3 : 1).

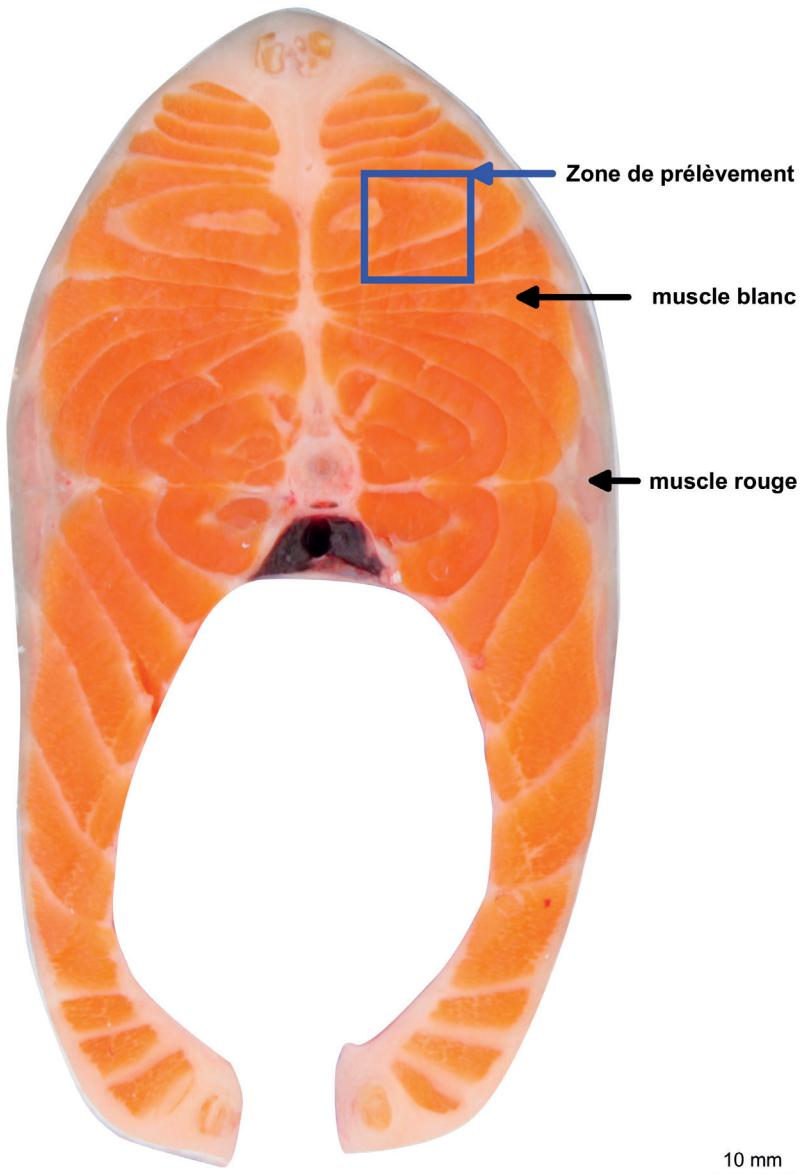


Figure 1 : Darne de truite arc-en-ciel prélevée à l'aplomb de la nageoire dorsale avec la localisation des muscles blanc et rouge et la zone de prélèvement histologique.

Après déshydratation à l'aide de bains de concentrations croissantes d'alcool, puis dans 3 bains de butanol, les échantillons sont imprégnés dans la paraffine (automate d'inclusion STP 120, Thermo Scientific). Ils sont ensuite orientés et inclus dans un bloc de paraffine pour permettre leur coupe (station d'enrobage Medite, modèle TBS 88). Des coupes de muscle de 10 µm, transversales à l'axe des fibres, ont été réalisées avec un microtome (Microm HM 355S), puis déposées sur lame de verre et déparaffinées (automate Myreve SS30) par immersion dans du xylène, hydratées dans des bains de concentrations décroissantes d'éthanol puis immergées dans de l'eau distillée.

Coloration Rouge Sirius et Vert « Rapide » :

Les lames sont incubées 10 minutes (min) dans un colorant constitué d'un mélange de Rouge Sirius 0,1 % (Direct Red 80 Fluka Cl 3570) et de Vert « Rapide » 0,1 % (FCF Gurr LI 42053) dans une solution aqueuse saturée d'acide picrique (Réf Prolabo code 206642231) [2]. Après coloration les coupes sont déshydratées 10 min dans l'alcool isopropylique puis passées 5 min dans du toluène et montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage constitué d'un mélange d'afcolène (polystyrène standard), toluène et phtalate de butyle (200 g / 850 mL / 97 mL).

Coloration au Rouge Sirius :

Les lames sont incubées 15 min dans une solution de Rouge Sirius à 0,1 % dans l'acide picrique saturée (labo moderne CL640740), puis successivement 5 min dans l'éthanol 96, et 5 min dans l'éthanol 100, et enfin 10 min dans un bain de xylène avant le montage des lames à l'afcolène.

Marquage agglutinine de germe de blé (WGA) :

Après déparaffinage, les coupes sont incubées 3h à température ambiante avec une lectine couplée à un fluorochrome Alexa Fluor (WGA Wheat Germ Agglutinin, Molecular Probes # W11262) à 5 µg/mL dans un tampon phosphate salin (PBS), puis après 3 lavages dans du PBS, elles sont contre-colorées au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Les lames sont finalement montées entre lame et lamelle avec du Mowiol (calbiochem, ref 455904). Cette lectine, qui a une affinité pour les N-acetyl-glucosamine et l'acide N-acetyl-neuraminique (acide sialique), permet de visualiser le tissu conjonctif et ainsi le contour des fibres musculaires.

Les lames sont observées avec un microscope à épifluorescence droit à champ large (Nikon 90i ou Leica DM6B) équipé de caméras numériques (Nikon Ds-Ri1, Leica K3C et K5).

Analyse d'images :

L'analyse de la taille des fibres musculaires a été réalisée initialement sur les images en utilisant des méthodes de segmentation classique (filtrage, seuillage, morphologie mathématique) permettant de mesurer la surface individuelle des fibres musculaires avec les logiciels Visilog et Fiji [3]. Plus récemment, des modèles d'IA génériques basées sur des réseaux de neurones comme cellpose [4] spécialement conçu et entraîné pour segmenter des cellules (modèle Cyto et Cyto2), ont été utilisés. À partir des modèles existants (Cyto et Cyto2), et après corrections manuelles des erreurs, des modèles ont été entraînés sur nos images de fibres musculaires afin d'améliorer la qualité de la segmentation, comme décrit par Pachitariu et Stringer [5]. Les images des fibres segmentées (images label) ainsi obtenues sont analysées à l'aide de Fiji afin de mesurer la surface de chaque fibre et de calculer son diamètre selon la formule Diamètre = $2\sqrt{Surface/\pi}$, en faisant l'hypothèse que les fibres sont circulaires.

Les figures ont été réalisées avec le plugin Fiji Ezfig [7].

Analyses statistiques :

Les données sont ensuite analysées avec Excel et R, la distribution des diamètres est comparée avec la méthode décrite par Johnston *et al.* [6] avec le package SM.

RÉSULTATS

La coloration Rouge Sirius et Vert « Rapide » permet de visualiser en rouge les tissus conjonctifs, contenant du collagène, présents dans le muscle (myosepte, perimysium et endomysium) comme décrit précédemment [8], et en vert les fibres musculaires ce qui permet d'avoir une bonne identification de ces deux tissus et un bon contraste colorimétrique pour la mesure de la taille des fibres par analyse d'image (**Figure 2**).

La coloration avec le Rouge Sirius seul permet également de bien visualiser les structures conjonctives, toutefois les fibres musculaires apparaissent ici jaune orangé et donc pas autant contrastées vis-à-vis du tissu conjonctif qu'avec la coloration précédente. Toutefois, comme montré par Dolber *et al.* 1993 [9], nous avons pu observer que le Rouge Sirius présentait une forte fluorescence rouge avec l'utilisation d'un filtre Texas Red (596/615 nm excitation/émission) (**Figure 3**), et cette propriété nous a permis d'acquérir, sur les mêmes lames, des images en fond clair et en épifluorescence. Il apparaît qu'en épifluorescence on peut obtenir un très bon contraste entre les structures conjonctives (rouge) et les fibres musculaires qui ont la particularité de présenter de l'autofluorescence (vert).

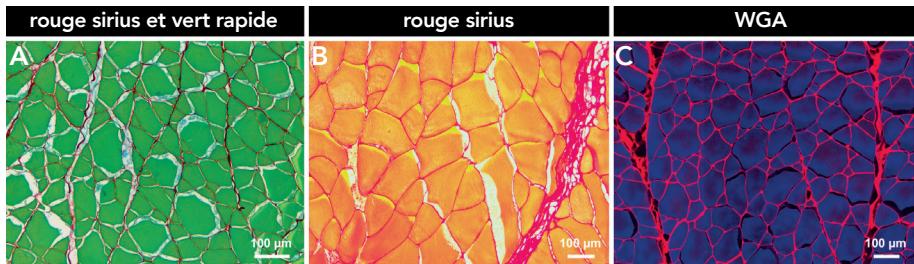


Figure 2 : Illustration des trois types de colorations réalisées sur le muscle blanc de truite arc-en-ciel afin de visualiser les fibres musculaires (en vert (A), jaune (B) ou bleu (C)) et le tissu conjonctif (en rouge) en microscopie à fond clair ou fluorescence (WGA), A : Rouge Sirius et Vert « Rapide », B : Rouge Sirius, C : WGA.

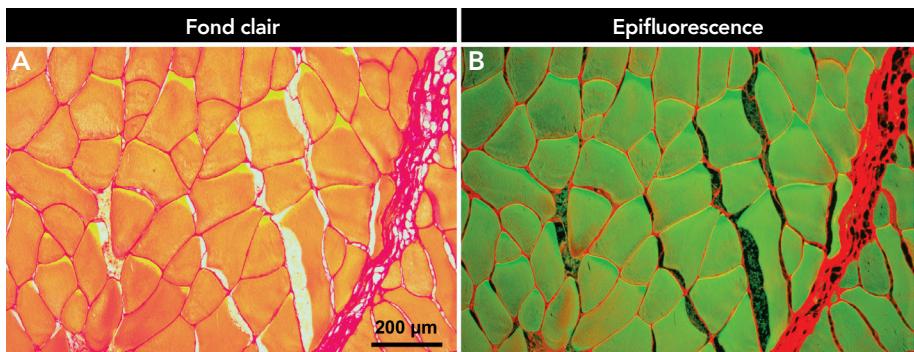


Figure 3 : Muscle blanc de truite arc-en-ciel coloré au Rouge Sirius et observé au microscope à champ large en fond clair (A) et en épifluorescence (B, filtre FITC et Texas Red), en jaune (A) et vert (B) les fibres musculaires, en rouge le tissu conjonctif. A et B sont au même grossissement.

Le marquage au WGA (**Figure 2C**) permet d'obtenir une fluorescence spécifique des tissus conjonctifs, les fibres musculaires n'étant cette fois pas marquées. Toutefois il est possible d'exploiter les propriétés d'autofluorescence des tissus pour, par exemple, exciter les coupes avec un filtre DAPI (350/470 nm) comme sur la **figure 2C** ou Isothiocyanate de Fluorescéine (FITC) (498/517 nm) pour visualiser les fibres et ainsi obtenir un marquage contrasté entre les deux tissus.

Les méthodes de traitement d'image classique permettent de segmenter les fibres musculaires mais il est souvent nécessaire d'effectuer des retouches manuelles car les algorithmes de segmentation sont difficiles à rendre suffisamment robuste pour s'adapter à l'hétérogénéité des colorations et aux différences de taille des cellules que l'on peut imager. On observe ainsi de nombreuses erreurs avec, par exemple, des fibres coupées en deux ou au contraire deux fibres non séparées lorsque l'endomysium est très fin et ne permet pas d'avoir une délimitation nette (**Figure 4**).

L'utilisation de cellpose, qui est un réseau de neurones dédiés à la segmentation des cellules, permet de limiter ces erreurs (**Figure 4**). L'entraînement d'un modèle cellpose après corrections manuelles des erreurs du modèle Cyto2 a permis d'améliorer la segmentation et de tenir compte du phénomène de rétraction observé sur certaines fibres musculaires pour mesurer précisément la surface totale de la fibre (**Figure 5**).

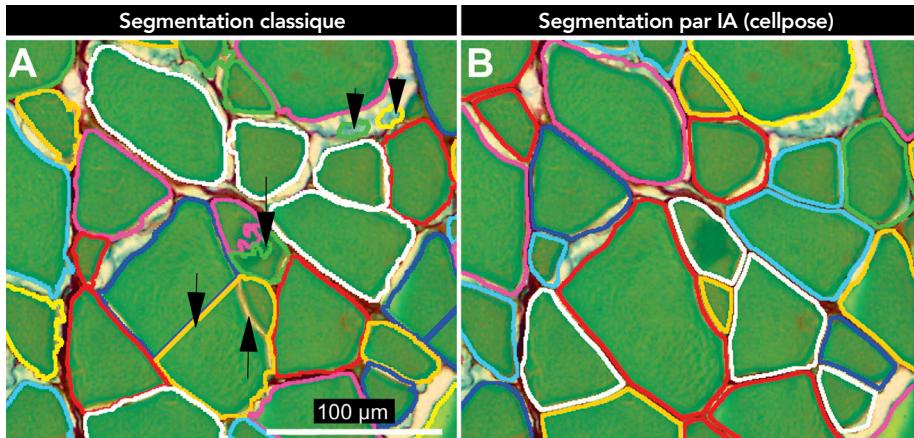


Figure 4 : Muscle blanc de truite arc-en-ciel coloré au Rouge Sirius et Vert « Rapide » analysé avec des méthodes classiques (A) et par IA (B) avec le réseau de neurones cellpose et le modèle Cyto2. Les flèches montrent les erreurs des méthodes classiques lorsque la délimitation des fibres est peu évidente ou que la coloration est hétérogène. Les contours en couleur montrent le résultat de la segmentation des fibres.

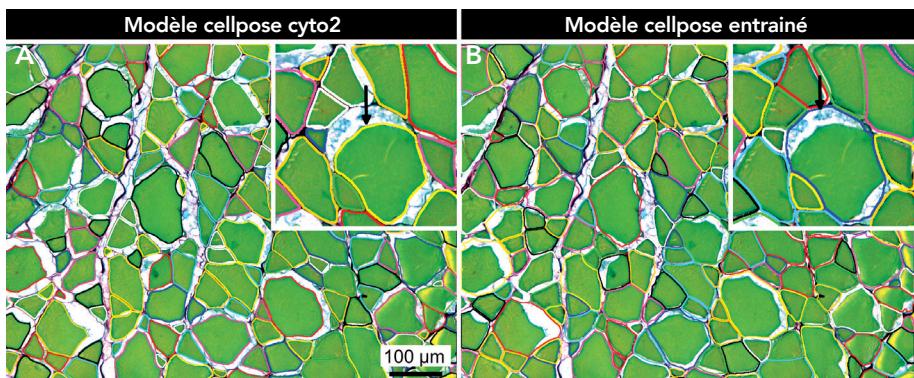


Figure 5 : Muscle blanc de truite arc-en-ciel coloré au Rouge Sirius et Vert « Rapide » analysé avec cellpose et le modèle Cyto2 (A) et un modèle Cyto2 re-entraîné (B) pour tenir compte de la rétraction de certaines fibres. La flèche dans l'encart montre une fibre dont la rétraction a été prise en compte avec le nouveau modèle. Les contours en couleur montrent le résultat de la segmentation des fibres.

DISCUSSION

L'analyse de la taille des fibres en histologie reste une technique de choix pour quantifier les mécanismes cellulaires de la croissance du muscle, notamment chez les animaux d'élevage et les espèces modèles [1]. Les méthodologies les plus communes sont la réalisation de coupes de tissus congelés au cryostat et des colorations topographiques comme l'hématoxyline-éosine et hématoxyline-éosine-safran [10,11] suivies d'une analyse des images avec des techniques semi-automatiques ou automatiques [12,13].

La congélation des échantillons, qui nécessite de disposer d'azote liquide, peut toutefois être difficile à mettre en œuvre, notamment dans des lieux de prélèvements (installations expérimentales, piscicultures) éloignés du laboratoire. De plus, les coupes au cryostat peuvent être délicates à obtenir avec, par exemple, la présence de points de congélation qui altèrent l'intégrité des fibres [14]. Ainsi, nous avons choisi de fixer chimiquement les échantillons au moment du prélèvement. La déshydratation et l'inclusion en paraffine se fait ensuite au laboratoire avec des automates. Les coupes paraffine de muscle présentent toutefois fréquemment des artefacts de type rétraction des fibres dont il faut tenir compte lorsque l'on mesure leur surface.

Nos colorations ont évolué conjointement avec les algorithmes de traitement d'image. Initialement, avec des méthodes classiques de seuillage et morphologie mathématique, il était nécessaire d'avoir des structures tissulaires bien contrastées sur les images, afin de distinguer les pixels appartenant aux fibres musculaires de ceux correspondant au tissu conjonctif. Le Rouge Sirius associé au Vert « Rapide », puis le WGA avec la coloration très contrastée du contour des fibres, permettent de bien segmenter les fibres avec des techniques classiques. Cependant, le contraste, et donc la facilité de segmentation, est meilleur avec le WGA qu'avec le Rouge Sirius. Le WGA est également plus facile à mettre en œuvre que des techniques d'immunomarquage de protéines de la lame basale comme la laminine, la dystrophine ou le collagène [15]. Néanmoins, le temps de traitement des lames est plus long car essentiellement manuel avec le dépôt de la solution de WGA en goutte sur chaque lame. Bien que le WGA soit moins cher (200 euros les 5 mg) que des anticorps (500 euros les 100 µL) il serait couteux de réaliser ce marquage avec un automate de coloration étant donné les volumes nécessaires (300 mL pour le volume de station sur le Myreva SS30 MM France).

Avec l'avènement des outils d'intelligence artificielle, basés sur l'entraînement de réseaux de neurones profonds, il est devenu beaucoup plus facile de segmenter des cellules et ce même avec des images présentant un faible contraste [16]. Une coloration simple, rapide, compatible avec les automates de coloration comme le Rouge Sirius permet d'obtenir des images dont le contraste bien que plus faible qu'avec les colorations précédentes est suffisant pour être analysé avec des méthodes d'IA comme cellpose. De plus, la capacité des réseaux de neurones à généraliser ce

qui permet d'identifier une cellule d'une autre (segmentation d'instance), permet une adaptation rapide à la variabilité biologique et technique. Ceci évite, contrairement aux méthodes classiques, de devoir développer une nouvelle procédure de segmentation pour chaque type de coloration. De plus, les méthodes d'IA entraînées spécifiquement sur nos images ont permis de résoudre le problème de rétraction des fibres et ainsi de mesurer la surface de la fibre en tenant compte de ce phénomène. Avec ces choix méthodologiques, il est possible d'augmenter le débit et la précision des analyses, ce qui permet de phénotyper un grand nombre d'individus et obtenir des résultats plus robustes. Il est par exemple conseillé de mesurer le diamètre de 800 à 1000 fibres musculaires par poisson [6] et ce parfois sur des centaines de poissons. Un tel échantillonnage est également facilité par l'utilisation de scanners de lames qui permettent d'acquérir rapidement de grandes surfaces de tissus avec une bonne résolution [17].

Le gain de précision et la capacité des modèles d'IA à segmenter des images de sections de muscle colorées de différentes manières en font donc une méthode de choix. Le réseau de neurones cellpose présente de très bonnes performances pour analyser la taille des fibres musculaires [22]. Toutefois, même avec ce type d'outils, les images de fibres musculaires de poissons restent difficiles à segmenter parfaitement. En effet, la présence conjointe des deux mécanismes de croissance musculaire, hyperplasie et hypertrophie, aboutit à une forte hétérogénéité de la taille des fibres. Ainsi, sur des poissons entre 30 et 300 g de poids vif, nous avons pu observer une distribution très large de la taille des fibres (10 à 150 µm de diamètre, **Figure 6**).

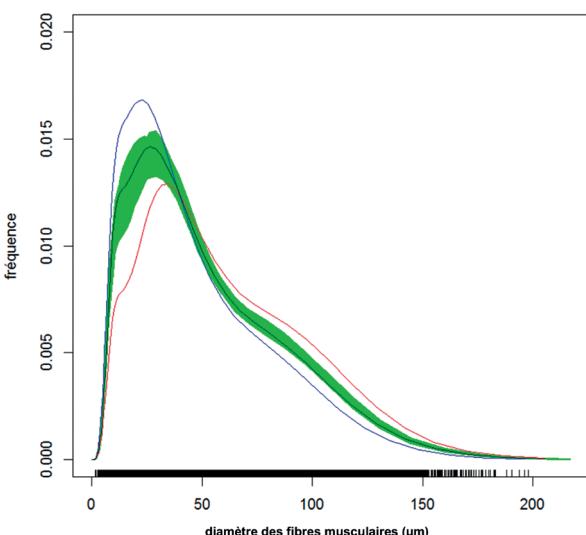


Figure 6 : Distribution du diamètre des fibres du muscle blanc de truite arc-en-ciel d'une lignée à muscle maigre (bleu) ou gras (rouge) d'un poids moyen de 380 g d'après [19]. En vert, la bande de variabilité autour de la moyenne des deux groupes.

Cela reste une limite pour les outils d'IA comme cellpose car il est nécessaire de définir, dans les paramètres, un diamètre moyen des cellules à partir duquel le réseau de neurones va adapter son mode de détection. Par conséquent, nous avons pu observer qu'il ne peut pas détecter à la fois les petites et les grosses fibres musculaires. La combinaison de deux analyses réalisées avec deux diamètres différents peut être nécessaire mais ne permet pas toujours de conserver les plus petites fibres lorsque celles-ci sont trop proches d'une grosse. Des corrections manuelles doivent donc être réalisées sur ce type d'image. Le développement de nouveaux algorithmes d'IA devrait permettre de résoudre ces difficultés.

La mise en œuvre de ces techniques dans nos projets de recherche a démontré l'impact des conditions d'élevage sur la structure musculaire des poissons. Une nage induite par un courant (0 à 2 longueurs/s) entraîne une hypertrophie musculaire, caractérisée par une augmentation du diamètre moyen des fibres [18]. La sélection des truites selon leur teneur en lipides musculaires s'accompagne, chez la lignée grasse, d'une hypertrophie et d'une réduction du nombre de fibres par rapport à la lignée maigre [19].

Nous avons également observé une corrélation entre la taille des fibres musculaires et la qualité des produits. Les truites qui présentent un meilleur rendement en filet présentent un plus grand nombre de fibres (+ 22 %) mais de taille comparable à celles ayant un rendement plus faible [20]. Enfin, la taille des fibres influence la fermeté de la chair : des fibres plus petites sont associées à des filets plus fermes [19,21].

CONCLUSION

L'évolution des méthodes d'histologie, de microscopie et de traitement d'images a permis un gain de temps et de précision dans la mesure de la taille des fibres musculaires. Les méthodes d'analyse des images basées sur l'IA ont très vite montré leur supériorité pour identifier automatiquement les fibres musculaires et ainsi augmenter le débit des analyses. Ces méthodologies restent des techniques de choix pour mieux comprendre les modalités de croissance du muscle des poissons et leurs liens avec la qualité des produits.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Béatrice Porcon et Véronique Lebret pour la préparation des échantillons et l'analyse des images.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. LISTRAT A., LEBRET B., LOUVEAU I., ASTRUC T., BONNET M., LEFAUCHEUR L., PICARD B. & BUGEON J. How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. *The Scientific World Journal*, 2016, 1-14.
2. LÓPEZ-DE LEÓN A. & ROJKIND M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1985, **33** (8), 737-743.
3. SCHINDELIN J., ARGANDA-CARRERAS I., FRISE E., KAYNIG V., LONGAIR M., PIETZSCH T., PREIBISCH S., RUEDEN C., SAALFELD S., SCHMID B., TINEVEZ J.-Y., WHITE D.J., HARTENSTEIN V., ELICEIRI K., TOMANCAK P. & CARDONA A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 2012, **9** (7), 676-682.
4. STRINGER C., WANG T., MICHAELOS M. & PACHITARIU M. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nature Methods*, 2021, **18** (1), 100-106.
5. PACHITARIU M. & STRINGER C. Cellpose 2.0: how to train your own model. *Nature Methods*, 2022, **19** (12), 1634-1641.
6. JOHNSTON I.A., STRUGNELL G., MCCRACKEN M.L. & JOHNSTONE R. Muscle growth and development in normal-sex-ratio and all-female diploid and triploid Atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology*, 1999, **202** (15), 1991-2016.
7. AIGOUY B. & MIROUSE V. ScientiFig: a tool to build publication-ready scientific figures. *Nature Methods*, 2013, **10** (11), 1048-1048.
8. BUGEON J., VEISETH E., TAYLOR R., LEFEVRE F. & FAUCONNEAU B. Caractérisation histologique du tissu conjonctif intramusculaire de truite. *Revue Française d'Histotechnologie*, 1999, **12** (1), 71-80.
9. DOLBER P.C. & SPACH M.S. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1993, **41** (3), 465-469.
10. JOHNSTON I.A., FERNÁNDEZ D.A., CALVO J., VIEIRA V.L.A., NORTH A.W., ABERCROMBY M. & GARLAND T. Reduction in muscle fibre number during the adaptive radiation of notothenioid fishes: a phylogenetic perspective. *Journal of Experimental Biology*, 2003, **206** (15), 2595-2609.

11. ASTRUCT, DESFRÉTIÈRES A. & VÉNIEN A. Histological Study of Ultrastructural Changes in Muscle Exposed to Various Concentrations of NaCl Brine. *Journal of Food Science*, 2018, **83** (5), 1221-1228.
12. DANCKAERT A., TRIGNOL A., LE LOHER G., LOUBENS S., STAELS B., DUEZ H., SHORTE S.L. & MAYEUF-LOUCHART A. MuscleJ2: a rebuilding of MuscleJ with new features for high-content analysis of skeletal muscle immunofluorescence slides. *Skeletal Muscle*, 2023, **13** (1), 14.
13. BRUN A., MOUGEOT G., DENIS P., COLLIN M.L., POUCHIN P., MONTAURIER C., WALRAND S., CAPEL F. & GUEUGNEAU M. A new bio imagery user-friendly tool for automatic morphometry measurement on muscle cell cultures and histological sections. *Scientific Reports*, 2024, **14** (1), 3108.
14. NIX J.S. & MOORE S.A. What Every Neuropathologist Needs to Know: The Muscle Biopsy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2020, **79** (7), 719-733.
15. STEVENS C.R., BERENSON J., SLEDZIONA M., MOORE T.P., DONG L. & CHEETHAM J. Approach for semi-automated measurement of fiber diameter in murine and canine skeletal muscle. *PLOS ONE*, 2020, **15** (12), e0243163.
16. RONNEBERGER O., FISCHER P. & BROX T. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. 2015. <https://arxiv.org/abs/1505.04597> (consulté le 27 novembre 2024).
17. MAYEUF-LOUCHART A., HARDY D., THOREL Q., ROUX P., GUENIOT L., BRIAND D., MAZERAUD A., BOUGLÉ A., SHORTE S.L., STAELS B., CHRÉTIEN F., DUEZ H. & DANCKAERT A. MuscleJ: a high-content analysis method to study skeletal muscle with a new Fiji tool. *Skeletal Muscle*, 2018, **8** (1), 25.
18. BUGEON J., LEFEVRE F. & FAUCONNEAU B. Fillet texture and muscle structure in brown trout (*Salmo trutta*) subjected to long-term exercise: Muscle structure and flesh texture of brown trout. *Aquaculture Research*, 2003, **34** (14), 1287-1295.
19. LEFÈVRE F., BUGEON J., GOARDON L., KERNÉIS T., LABBÉ L., PANSERAT S., MÉDALE F. & QUILLÉT E. Seven generations of selection for muscle fat content greatly affect rainbow trout flesh quality and muscle fiber size. *Aquaculture Reports*, 2024, **38**, 102343.

20. BUGEON J., LEFEVRE F., CARDINAL M., UYANIK A., DAVENEL A. & HAFFRAY P. Flesh quality in large rainbow trout with high or low fillet yield. *Journal of Muscle Foods*, 2010, **21** (4), 702-721.
21. LEFEVRE F., CARDINAL M., BUGEON J., LABBE L., MEDALE F. & QUILLET E. Selection for muscle fat content and triploidy affect flesh quality in pan-size rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 2015, **448**, 569-577.
22. WAISMAN A., NORRIS A.M., ELÍAS COSTA M. & KOPINKE D. Automatic and unbiased segmentation and quantification of myofibers in skeletal muscle. *Scientific Reports*, 2021, **11** (1), 11793.