

Méthode de mesure de la longueur des sarcomères de la viande par acquisition d'image et transformée de Fourier

Frédéric Peyrin¹, David Cormier¹, Jacques Lepetit¹

Résumé : *Afin de contrôler les paramètres intervenant dans la tendreté de la viande, nous mettons en œuvre une méthode de mesure dimensionnelle estimant la longueur des sarcomères des fibres musculaires. Cette méthode est basée sur l'acquisition d'image et l'analyse de Fourier.*

Mots clés : viande, mesures dimensionnelles, instrumentation optique, transformée de Fourier, analyse d'image, MATLAB[®].

Introduction

L'influence de la longueur des sarcomères sur la qualité de la viande a été mise en évidence par Locker (1960). On avait observé à cette époque que des muscles refroidis très rapidement après l'abattage d'un animal donnaient des viandes très dures après chauffage (Marsh et Leet, 1966). La dureté pouvait être multipliée par un facteur 3. Locker (1960) a montré en mesurant la longueur des sarcomères par observation microscopique que ces viandes étaient contractées. On dit de ces viandes qu'elles ont subies une contraction au froid. Ce phénomène est dû à la libération de calcium dans le cytoplasme de la fibre musculaire ce qui induit une contraction musculaire. La contraction produite par une basse température positive peut atteindre 40% à 60%. Egalement, il apparaît une contraction importante du muscle s'il est maintenu à température élevée après l'abattage d'un animal. Il existe donc un optimum de barème thermique à appliquer à un muscle après la mort d'un animal pour ne pas altérer sa tendreté. Les conditions optimales retenues par exemple dans le cas du bovin sont d'atteindre 10-12°C en 10 heures. Il y a un antagonisme entre la nécessité de diminuer rapidement la température d'une carcasse pour limiter la croissance bactérienne et la nécessité de ne pas refroidir trop rapidement afin d'éviter la contraction au froid. Dans la pratique industrielle le phénomène de contraction au froid est fréquent au moins pour les muscles superficiels, d'où la nécessité de la mesure de longueur des sarcomères lorsqu'on étudie l'origine des variations de tendreté.

La connaissance de la longueur des sarcomères est également une donnée indispensable dans les études visant à relier l'organisation des structures du muscle aux propriétés mécaniques de la viande. En effet la longueur des sarcomères est un repère de déformation. De sa valeur dépend l'organisation des autres structures telles que les fibres de collagène et d'élastine des tissus conjonctifs endomysial et perimysial. Des modèles théoriques ont été développés pour relier la longueur des sarcomères à des caractéristiques d'organisation des fibres de collagène et d'élastine (Field and Faber 1970, Rowe, 1974, Lepetit, 1991) et à des propriétés mécaniques des structures (Purslow, 1989) ou de la viande (Lepetit, 2000).

¹ Inra UR qualité des produits animaux - 63122 Saint Genès Champanelle

☎ 04 73 62 42 59

✉ peyrin@clermont.inra.fr

Les fibres musculaires sont des cellules cylindriques entourées de la membrane plasmique. Elles mesurent de 10 à 100 μm de diamètre selon l'espèce animale et peuvent atteindre 30 cm de longueur. Elles contiennent des noyaux, des mitochondries, le réticulum sarcoplasmique ainsi que des myofibrilles. Chaque fibre musculaire contient plusieurs centaines de myofibrilles qui sont le siège de la contraction musculaire. Le diamètre transversal d'une myofibrille est d'environ 1 à 3 μm . Au microscope optique, les myofibrilles présentent une alternance régulière de zones sombres (bandes A, terme dérivé d'Anisotrope) et de zones claires (bandes I, terme dérivé d'Isotrope) (**figure 1**).

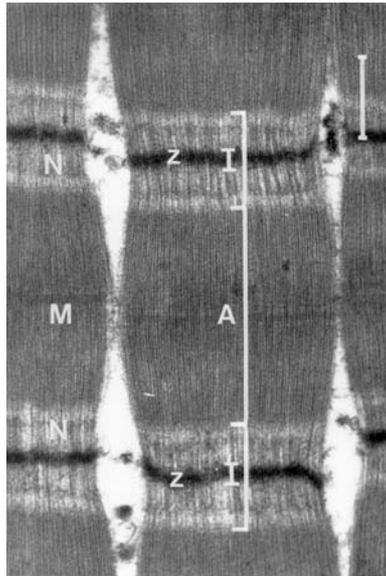


Figure 1 : observation en microscopie électronique à transmission du sarcomère. Mise en évidence des stries Z dont la périodicité est ici analysée par transformée de Fourier, barre=0.5 μm . Photo © T.Astruc et X.Vignon / Inra

Dans la partie centrale de la bande I se trouve un disque qui apparaît en microscopie sous la forme d'une strie dite « strie Z ». Le volume compris entre deux stries Z est dénommé le sarcomère. C'est l'élément de base de la contraction musculaire.

In vivo, la longueur des sarcomères est de l'ordre de 2.1 μm pour un muscle à l'état de repos. Après la mort d'un animal, lorsque les réserves énergétiques du muscle sont pratiquement épuisées le sarcomère se contracte légèrement jusqu'à une valeur de 2 μm pour un muscle qui était initialement à l'état de repos. C'est la contraction de la *rigor*.

En pratique, la détermination de la longueur des sarcomères peut être faite à partir d'une observation microscopique en comptant le nombre de sarcomères par unité de longueur : c'est une opération longue et fastidieuse, pouvant être en partie sous dépendance du manipulateur. Elle est plus généralement réalisée par diffraction d'une lumière monochromatique Laser sur un échantillon broyé après fixation dans du glutaraldéhyde. Dans ce cas, la mesure de distance entre les arcs de diffraction obtenus sur un grand nombre d'échantillons peut être manuelle (Cross, 1980, Young, 1990) ou automatique (Gif, 1995). Cet article présente une méthode alternative de mesure basée sur l'acquisition d'images microscopiques de fibres musculaires isolées et sur le traitement sur de ces images par transformée de Fourier (encadré).



Transformée de Fourier discrète à deux dimensions

La **transformée de Fourier discrète** (TFD) est un outil mathématique de traitement du signal numérique, qui est l'équivalent discret de la transformée de Fourier continue utilisée pour le traitement du signal analogique.

Sa définition mathématique pour un signal f de N échantillons est la suivante :

$$F(u) = \frac{1}{N} \sum_{x=0}^{N-1} f(x) \cdot e^{-2\pi i x u / N}$$

On obtient ainsi une représentation spectrale du signal échantillonné initial.

La transformée inverse est donnée par :

$$f(x) = \sum_{u=0}^{N-1} F(u) \cdot e^{2\pi i x u / N}$$

Dans le cas d'une image, il s'agit d'un signal f à deux dimensions N et M . L'expression de la transformée de Fourier discrète devient :

$$F(u, v) = \frac{1}{NM} \sum_{x=0}^{N-1} \sum_{y=0}^{M-1} f(x, y) \cdot e^{-2\pi i (x u / N + y v / M)}$$

La nouvelle représentation $F(u, v)$ est le spectre de la fonction $f(x, y)$. C'est un tableau de dimension (N, M) de nombres complexes dont on peut représenter les normes visuellement dans une nouvelle image.

La transformée inverse est donnée par :

$$f(x, y) = \sum_{u=0}^{N-1} \sum_{v=0}^{M-1} F(u, v) \cdot e^{2\pi i (x u / N + y v / M)}$$

Voir aussi :

http://fr.wikipedia.org/wiki/Transformée_de_Fourier_discrète

http://www-timc.imag.fr/Thomas.Guyet/enseignements/TI/TI_04_05/ImagesDFT.pdf

1. Théorie mathématique de la transformée de Fourier et application en physique

En analyse mathématique, la transformation de Fourier généralise la théorie des séries de Fourier aux fonctions non périodiques et elle permet de leur associer un spectre en fréquences. On cherche ensuite à obtenir l'expression de la fonction comme « somme infinie » des fonctions trigonométriques de toutes les fréquences qui forment son spectre. Une telle sommation se présentera donc sous forme d'intégrale. Séries et transformation de Fourier constituent les deux outils de base de l'analyse harmonique. La transformée de Fourier, notée TF, est une opération qui transforme une fonction intégrable en une autre fonction, décrivant le spectre en fréquences de la fonction initiale. La formule de la transformée de Fourier

inverse, opération notée TF^{-1} , est celle qui permet sous conditions de retrouver la fonction initiale.

En physique, cette transformation est utilisée en traitement du signal pour traiter des données temporelles et faire correspondre la variable Temps (période temporelle en secondes) et la Fréquence (en s^{-1} ou Hz) grâce à la détermination du spectre du signal. On peut aussi traiter des données spatiales : on associe alors par équivalence la variable Longueur (période spatiale en mètre) et la Fréquence Spatiale (en m^{-1}). Par ailleurs, l'acquisition des données est aujourd'hui réalisée grâce aux convertisseurs analogique-numérique (CAN). En conséquence, c'est la transformée de Fourier numérique qui est utilisée pour traiter ces données. Des hypothèses mathématiques existent pour simplifier les calculs et augmenter la vitesse du traitement numérique : on parle de transformée de Fourier rapide. Nous utilisons cette dernière pour analyser nos images : nous traitons chaque image comme une matrice de données dans un espace à deux dimensions. La transformée de Fourier est le résultat du calcul matriciel opéré selon les lignes et les colonnes de cette matrice [voir encadré].

2. Equipement matériel et logiciel

La prise d'image (**figure 2**) est réalisée à l'aide d'une caméra numérique noir et blanc (SONY SX-900UV 1,45 millions de pixels) montée sur un microscope LEICA DMRM. La caméra connectée à un ordinateur via le port IEEE1394 et pilotée par un driver générique est prise en charge par la boîte à outils « acquisition d'images » de MATLAB (MATrix LABoratory), une application de la société Mathworks™.

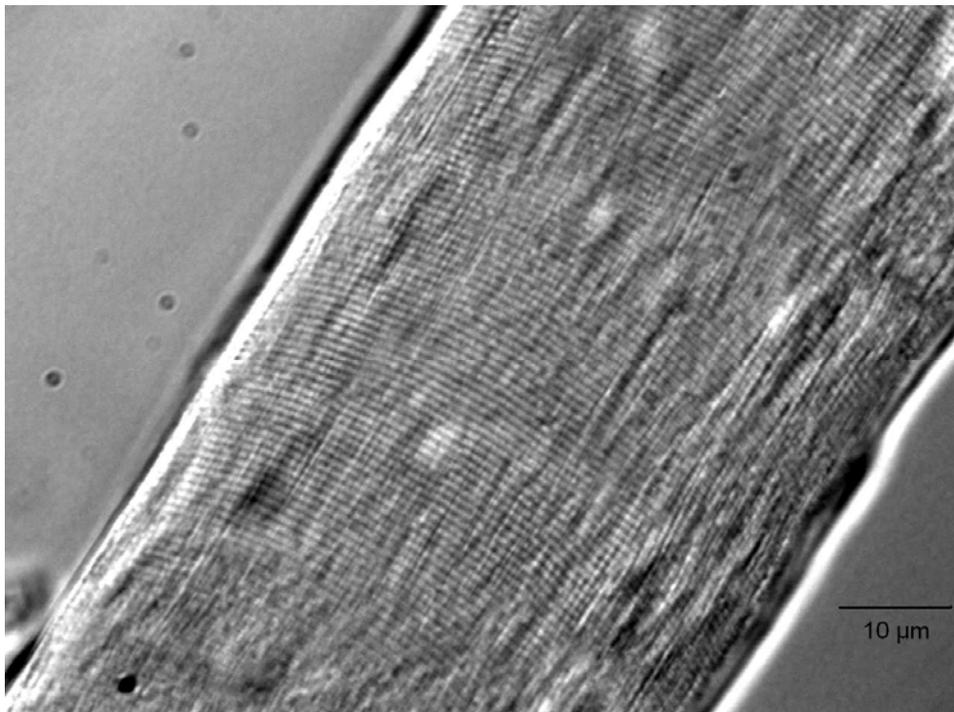


Figure 2 : image d'une fibre musculaire en microscopie optique en transmission ($\times 40$) ; périodicité d'environ $2\mu m$ entre deux stries Z définissant les sarcomères

MATLAB fournit un environnement de calcul matriciel interactif permettant la mise en œuvre des algorithmes de calcul. Ce logiciel est constitué d'un noyau relativement réduit, capable

d'interpréter puis d'évaluer les expressions numériques matricielles qui lui sont adressées, soit directement au clavier depuis une fenêtre de commande, soit sous forme de séquences d'expressions (*scripts*) enregistrées dans des fichiers « texte » appelés *m-files* et exécutées depuis la fenêtre de commande. Ce noyau est complété par une bibliothèque de fonctions prédéfinies et regroupées dans des boîtes à outils spécifiques : pour cette application, nous utilisons *Image acquisition Toolbox* et *Signal Processing Toolbox*.

Nous avons développé plusieurs interfaces graphiques « utilisateurs » grâce à l'utilitaire *Guide* de MATLAB. Celles-ci permettent, séquentiellement, de choisir le nom de l'opérateur et de l'expérimentation, de visualiser l'aperçu-vidéo pour le réglage du microscope et de la caméra, d'acquérir l'image optimisée, d'enregistrer cette image au format *.tiff* ou *.mat* (format matriciel pour MATLAB), de calculer la transformée de Fourier rapide de l'image (**figure 3**), et enfin, d'analyser les résultats de calcul afin de déterminer la longueur des sarcomères.

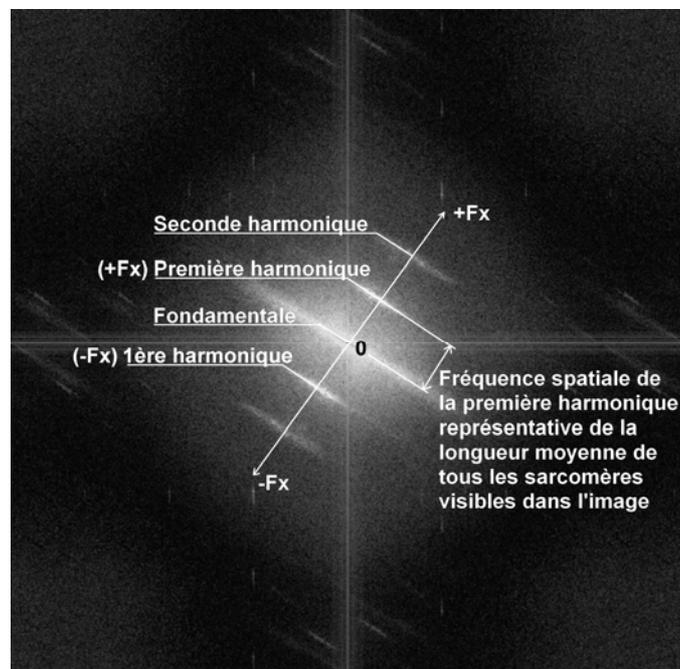


Figure 3 : transformée de Fourier numérique de l'image de la Figure 2

Les paramètres de réglage du microscope, de la caméra ainsi que les paramètres liés à l'échantillon sont enregistrés dans un premier fichier Excel. L'ensemble des résultats de mesures est stocké dans un second fichier de synthèse au format Excel (**figure 4**).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Nom_Fichier	N° Animal	Muscle	Etat	Traitement	contrainte	Long_Manuelle_spatiale	Longueur_Manuelle Freq	Longueur_Auto Freq	Valeur_Calibration_xy	Valeur_Calibration_Fxy
2	2006-02-03_13H57mn21s.xls	4	SM	Cru	Frais	Etirement 80%	2.94973	2.69504	8.87576	0.14524	0.0086666
3	2006-02-03_13H59mn35s.xls	4	SM	Cru	Frais	Etirement 80%	3.66934	3.59185	3.6253	0.14524	0.0086666
4	2006-02-03_14H01mn17s.xls	4	SM	Cru	Frais	Etirement 80%	3.436	3.76409	18.0201	0.14524	0.0086666
5	2006-02-03_14H03mn27s.xls	4	SM	Cru	Frais	Etirement 80%	3.67105	3.63859	3.6253	0.14524	0.0086666
6	2006-02-03_14H04mn39s.xls	4	SM	Cru	Frais	Etirement 80%	3.62826	3.7036	3.59876	0.14524	0.0086666
7	2006-02-03_14H06mn05s.xls	4	SM	Cru	Frais	Etirement 80%	3.88593	3.41641	3.6746	0.14524	0.0086666
8	2006-02-03_14H15mn11s.xls	3	SM	Cru	Frais	Etirement 80%	4.02355	3.84683	18.0201	0.14524	0.0086666
9	2006-02-03_14H17mn48s.xls	3	SM	Cru	Frais	Etirement 80%	3.69933	3.62027	9.20872	0.14524	0.0086666

Figure 4 : exemple de résultats

3. Méthodes

Afin de déterminer la longueur des sarcomères, il faut préalablement calibrer l'ensemble microscope-caméra pour pouvoir établir une échelle sur les images dans le domaine spatial et fréquentiel. Le calibrage est notamment spécifique du grossissement microscopique utilisé. Une mire micrométrique est observée au microscope (**figure 5**). L'image de cette mire permet par pointage manuel de calibrer le dispositif et déterminer deux échelles, l'une sur l'image spatiale en μm par pixels et l'autre sur sa représentation fréquentielle en μm^{-1} par pixels.

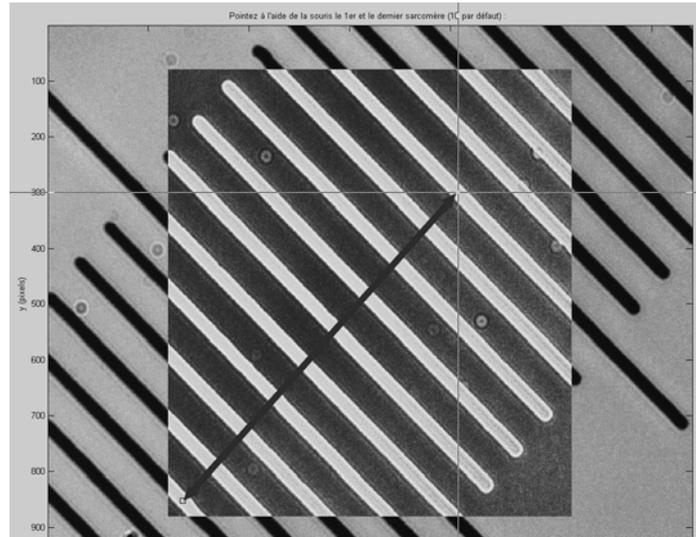


Figure 5 : image de la mire micrométrique (10 μm entre deux traits). Ici, l'opérateur a pointé 10 traits à l'intérieur de la région d'intérêt (carré en inverse vidéo)

Une fois ce calibrage effectué, le logiciel permet de mesurer directement la longueur des sarcomères et d'obtenir directement une valeur en μm selon les trois méthodes suivantes :

- la première méthode consiste à pointer à l'aide de la souris sur l'image le premier et dernier d'une série de plusieurs sarcomères. Le logiciel extrait ensuite la longueur moyenne des sarcomères en divisant par le nombre de sarcomères impliqués.
- la deuxième méthode consiste à pointer manuellement sur la représentation de la transformée de Fourier de l'image précédente l'un des deux pics de la première harmonique représentative du réseau des sarcomères dans la fibre. Le logiciel calcul par symétrie la distance euclidienne en μm^{-1} entre la fondamentale et cette première harmonique. La longueur moyenne des sarcomères est obtenue par transformée de Fourier inverse ; elle est donnée en μm .
- enfin, la troisième méthode permet la détection automatique des deux pics de première harmonique par analyse d'image. La représentation de la transformée de Fourier de l'image du sarcomère subit préalablement plusieurs traitements en niveau de gris ou en noir et blanc (filtre moyenneur, filtre morphologique « top hat », érosion, labellisation, classement par recherche de maxima locaux et calcul de la distance euclidienne entre deux points de la matrice). Comme dans la méthode manuelle, la longueur moyenne des sarcomères est également obtenue par transformée de Fourier inverse ; elle est donnée en μm .

La méthode de comptage des sarcomères sur l'image initiale a servi de référence pour valider les deux autres. Dans la **figure 6**, seule apparaît la validation de la méthode de mesure par pointage manuel sur la transformée de Fourier, pour une plage de longueurs de sarcomère comprise entre 0,7 et 4,5 μm ($y=0,9834x$, avec $R^2=0,993$). Par ailleurs, la méthode automatique est opérationnelle pour des longueurs de sarcomère supérieures à 1,5 μm seulement. Cette dernière méthode n'est donc pas suffisamment robuste pour le cas particulier des fibres musculaires hyper-contractées (sarcomères inférieurs à 1,5 μm). Dans ce cas, une meilleure connaissance de la variabilité de contraction au sein d'une même fibre et une étude supplémentaire en analyse d'image pourrait permettre d'affiner la méthode.

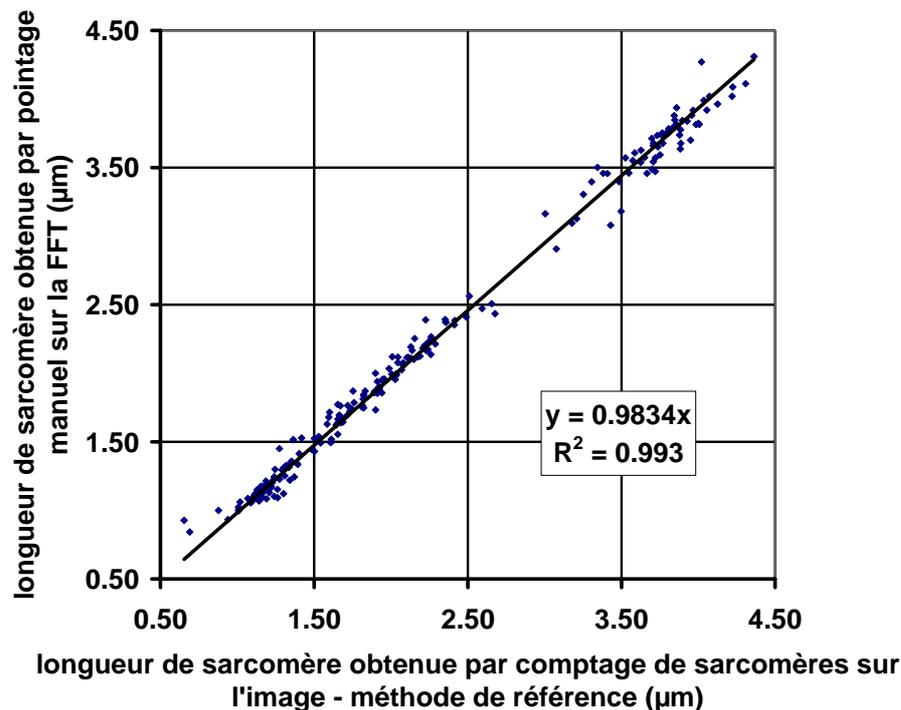


Figure 6 : Validation de la méthode de mesure par transformée de Fourier, Comparaison avec la méthode de comptage sur l'image initiale

4. Résultats

Dans cet exemple, la fibre musculaire utilisée provient du muscle *Semimembranosus*, cru et non congelé d'une vache de race Holstein âgée de 8 ans. La fibre est extraite mécaniquement avec des pinces ultrafines sous une loupe binoculaire dont le grossissement utilisé varie de 0.63 à 4. Ces fibres ont un diamètre de l'ordre de 50 micromètres et elles sont observées entre lame et lamelle à un grossissement de 40 sous microscope en lumière transmise. Les mesures dimensionnelles de longueur des sarcomères sont effectuées selon le mode opératoire décrit précédemment.

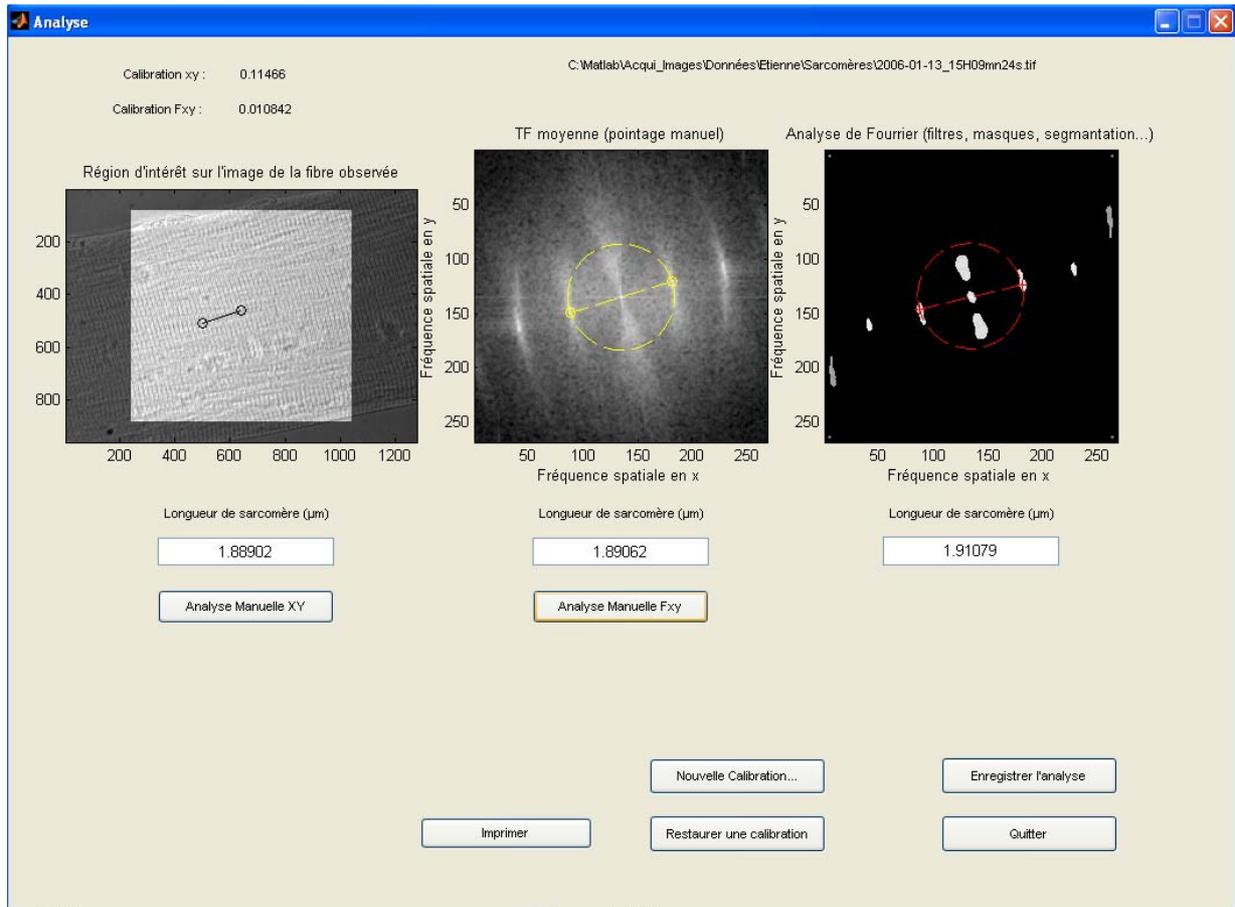


Figure 7 : Vue d'ensemble, fenêtre de commande sous environnement MATLAB

La figure 7 montre d'une part, l'interface graphique permettant de piloter l'ensemble et d'autre part, pour un essai sur une même fibre, le résultat des trois méthodes décrites précédemment. La valeur de la longueur des sarcomères mesurée ici est de $1,90 \mu\text{m}$. Le bilan des incertitudes systématiques et statistiques donne cette valeur à $0,10 \mu\text{m}$ près.

Conclusion

La méthode de mesure par transformée de Fourier est aujourd'hui utilisée en routine au laboratoire et permet la caractérisation des échantillons de tissu musculaire étudiés. Avec cette méthode nous avons, par exemple, déjà pu déterminer l'effet du délai entre l'abattage et la découpe sur la qualité des filets de poulet de différentes origines (Berri *et al.*, 2006). Cette méthode est également applicable à tout échantillon microscopique ou macroscopique, animal, végétal ou minéral de structure périodique.

Remerciements

Les auteurs remercient Etienne Dugourd et Cécile Berri pour leur participation à la validation expérimentale de cette méthode.

Bibliographie

- Berri C., Le Bihan-Duval E., Lepetit J., Baeza E., Bordeau T., Peyrin F., Brunel V. (2006) *Effet du délai entre abattage et découpe sur la qualité des filets de poulets labels, certifiés et standards*. JSMTV. Clermont-Ferrand.
- Cross H.R., West R.L., and Duston T.R. (1980) *Comparison of methods for measuring sarcomere length in beef semitendinosus muscle*. Meat Science 5 (1980-81) 261-266.
- Field R.W. and Faber J. J. (1970) *Biophysical Analysis of the Mechanical Properties of the Sarcolemma*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 48:394-404.
- Fourier J-B. J. (1822) *Théorie analytique de la chaleur*. Réédité aux éditions Jacques Gabay (25 rue du Dr Roux F-92330 à Sceaux) en 1988.
- Gif P., Tournayre P., Culioli J. (1995) *Automatisation d'un banc de mesure de la longueur des sarcomères de la viande par diffraction d'une lumière cohérente (LASER)*. Viandes Prod. Carnés 16(2).
- Lepetit J. (1991) *Theoretical Strain Ranges in Raw Meat*. Meat Science. 29(3):271-283.
- Lepetit J., Grajales A. and Favier, R. (2000) *Modelling the effect of sarcomere length on collagen thermal shortening in cooked meat: consequence on meat toughness*. Meat Science. 54:239-250
- Locker R. H. *Degree of Muscular Contraction as a Factor in Tenderness of Beef*. Food Research. 1960; 25:304-307.
- Marsh B. B. and Leet N. G. (1966) *Studies in Meat Tenderness. III. The Effects of Cold Shortening on Tenderness*. Journal of Food Science. 31:450-459.
- Purslow P. P. (1989) *Strain-Induced Reorientation of an Intramuscular Connective Tissue Network: Implications for Passive Muscle Elasticity*. J. Biomechanics. 22(1):21-31.
- Rowe, R. W. D. (1974) *Collagen Fibre Arrangement in Intramuscular Connective Tissue. Changes Associated with Muscle Shortening and Their Possible Relevance to Raw Meat Toughness Measurements*. Journal of Food Technology. 9:501-508.
- Young L.L., Papa C.M., and Lyon C.B. (1990) *Research Note: Comparison of Microscopic and Laser Diffraction Methods for Measuring Sarcomere Lengths of Contracted Muscle Fibers of Chicken Pectoralis Major Muscle*. Poultry Science. 69: 1800-1802.

