



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 17592

To cite this version : Bonnefont, Cécile and Guerra, Aurélie and Théron, Laetitia and Molette, Caroline and Canlet, Cécile and Fernandez, Xavier *Approche métabolomique pour la recherche de marqueurs métaboliques de la qualité technologique des foies gras.* (2013) In: Journées de la Recherche Avicole et des Palmipèdes à Foie Gras, 26 March 2013 - 28 March 2013 (La Rochelle, France).

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

APPROCHE METABOLOMIQUE POUR LA RECHERCHE DE MARQUEURS METABOLIQUES DE LA QUALITE TECHNOLOGIQUE DES FOIES GRAS

Bonnefont Cécile¹, Guerra Aurélie¹, Théron Laëticia¹, Molette Caroline¹²,
Canlet Cécile³, Fernandez Xavier¹

¹ INRA, INPT-ENSAT, INPT-ENVT, UMR TANDEM, chemin de Borde Rouge, 31326 castanet

² UMR0444LGC - chem. de Borde Rouge – 31326 CASTANET-TOLOSAN

³ INRA, UMR1331 TOXALIM - chem. de Tournefeuille – 31027 TOULOUSE

cecile.bonnefont@ensat.fr

RÉSUMÉ

La maîtrise de la fonte lipidique des foies gras à la cuisson représente aujourd'hui un enjeu majeur pour les acteurs de la filière. L'amélioration des différentes étapes : élevage-gavage, abattage et transformation des foies a permis de réduire les pertes lipidiques à la cuisson. Cependant une part de la variabilité de ce paramètre reste mal contrôlée. Pour mieux comprendre cette variabilité, les caractéristiques intrinsèques de deux groupes de foies gras avec des valeurs extrêmes de rendement technologique ont été comparées. Leurs métabolites hydrophiles ont été analysés en RMN du proton, puis comparés. Ces résultats ont renforcé l'idée que i) le catabolisme protéique est plus élevé dans les foies avec des rendements technologiques faibles que dans ceux avec des rendements élevés et ii) que le stress oxydatif semble moindre dans les foies avec des rendements technologiques élevés. Les membranes plasmiques pourraient avoir une meilleure intégrité ce qui expliquerait la plus grande rétention de lipides lors de la cuisson dans ce groupe de foie gras.

ABSTRACT

Metabolomic study of duck fatty livers: identification by ¹H NMR of metabolic markers associated to technological quality

The control of fatty liver fat loss during cooking represents a major issue for fatty liver industry. The improvement of animal breeding and slaughter, and fatty liver transformation has enabled a reduction of fat loss. However a part of the variability of this parameter remains under-controlled. To provide enhanced insights this variability, intrinsic characteristics of two groups of fatty livers with extreme technological yield values were compared. Their hydrophilic metabolite profiles were analyzed by ¹H NMR. The results highlighted the assumption that i) the proteic catabolism is enhanced in fatty livers with low technological yield, ii) the oxidative stress is lower in the fatty livers with high technological yield. The plasma membranes could display better integrity, which could explain the higher retention of lipids during the cook in this fatty liver group.

INTRODUCTION

Outre les caractéristiques organoleptiques, l'une des problématiques majeures de la filière foie gras est le rendement technologique. Ce rendement correspond à l'inverse du taux de fonte lipidique à la cuisson. Récemment, Théron *et al.* (2011) ont identifié des marqueurs protéiques impliqués dans la variabilité du taux de fonte lipidique. Il a été montré que les foies avec des rendements technologiques élevés ont un profil métabolique d'accrétion, d'anabolisme, alors que les foies avec des rendements plus faibles ont développé des mécanismes de protection cellulaire.

Pour améliorer les connaissances sur la relation entre le métabolisme cellulaire du foie et le rendement technologique, des approches métabolomiques ont été réalisées sur les mêmes échantillons. Cette étude consiste en la comparaison des caractéristiques intrinsèques des foies avec des rendements technologiques extrêmes.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et transformation des foies gras

Un lot de 240 canards mulards a été élevé pendant 13 semaines puis gavé pendant 12 jours avec 2 repas par jour. Les canards ont été abattus 10 h après leur dernier repas. Les foies ont été retirés des carcasses 20 min après l'abattage et ils ont été refroidis sur glace pendant 6h. Des échantillons de foie ont été prélevés dans le talon du grand lobe à 20 min *post mortem* (*pm*). Ils ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide pour les analyses RMN. Après refroidissement, un morceau de 180g de foie a été prélevé dans la partie centrale des deux lobes pour être transformé en verrine (12g/kg de sel et 2g/kg de poivre, cuisson à l'autoclave : 1h à 85°C et 1 bar, valeur pasteurisatrice de 170 min). Après 2 mois de stockage à 4°C, les verrines ont été ouvertes et le gras exsudé pendant la cuisson a été retiré. Le rendement technologique à la cuisson a été calculé comme le rapport entre le poids de foie cuit sans le gras exsudé et le poids de foie cru. Les caractéristiques de l'ensemble des échantillons (n=240) sont présentées dans le tableau 1. A partir de ces foies, deux groupes ont été constitués de façon à avoir des valeurs du rendement technologique respectivement élevées (89,9% en moyenne, n=13) et faibles (68,3% en moyenne, n=12). Les autres caractéristiques de ces deux groupes de foies étaient équivalentes, y compris le poids des foies et leur teneur en lipides (tableau 1).

1.2. Préparation des échantillons et RMN ¹H

Les métabolites hydrophiles des échantillons de foies congelés ont été extraits par un mélange de chloroforme, d'eau et de méthanol d'après une méthode adaptée de Beckonert *et al.* (2007). La phase supérieure qui contenait l'eau et le méthanol avec les

métabolites hydrophiles a été prélevée et les solvants ont été évaporés au Speedvac© afin d'éliminer l'eau et le méthanol. Les échantillons ont alors été dilués dans de l'eau deutérée (D₂O) avec du TMSP (triméthylsilylpropionate de sodium). Les spectres de RMN du proton ont été obtenus avec un spectromètre Bruker DRX-600 Avance opérant à la fréquence de 600,13 MHz et équipé d'une sonde cryogénique inverse triple 1H-13C-15N 5 mm. Les réglages ont été réalisés manuellement sur un échantillon. La séquence de pulse « cpmgpr1d » (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) a été utilisée afin de supprimer le signal des grosses molécules (protéines). Les spectres ont été phasés et calibrés par rapport au pic du TMSP (δ 0 ppm) et la ligne de base a été corrigée. Les spectres ont été découpés en bandelettes de 0,01 ppm et le signal de chaque bandelette a été intégré, puis normalisé par rapport à l'intensité totale du spectre pour générer des variables quantitatives. Certaines bandelettes ont été retirées car elles correspondaient au déplacement chimique de contaminants (de 1,175 à 1,195 ppm pour l'éthanol, de 3,30 à 3,40 ppm pour le méthanol, de 4,40 à 5,10 pour l'eau et à 7,65 pour un contaminant non identifié).

1.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des variables quantitatives qui correspondent aux bandelettes du spectre RMN ont été effectuées avec le logiciel SIMCA P+ (version 12). Tout d'abord des analyses en composantes principales (ACP) ont permis d'observer les échantillons et de détecter les échantillons aberrants. L'ACP permet de maximiser la variance entre les échantillons, mais ici elle ne sépare pas les deux groupes d'échantillons (figure non présentée). Puis des analyses supervisées OPLS-DA (*Orthogonal Projection of Latent Structures – Discriminant Analysis*) ont été réalisées afin de maximiser la séparation entre les deux groupes de foies. Les axes obtenus sont appelés des variables latentes. La contribution des variables à chaque axe est décrite par la valeur d'importance VIP (*Variable Importance in Projection*). Lorsque celle-ci est supérieure à 2, la variable contribue de façon non négligeable à la variable latente. Les métabolites qui correspondent à ces variables ont été identifiés avec les bases de données HMDB (Human Metabolom Database, www.hmdb.ca) et BMRB (Biological Magnetic Resonance Bank, www.bmrw.wisc.edu). Les valeurs de R² et de Q² qui renseignent respectivement sur la pertinence et sur la prédiction du modèle OPLS-DA ont été enregistrées.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif de ce travail était de comparer les caractéristiques intrinsèques des foies gras prélevés juste après l'abattage et ayant des rendements technologiques respectivement faibles et élevés. Les échantillons de foies prélevés à 20min *pm* ont été

analysés par RMN du proton et leurs spectres ont été analysés par OPLS-DA (Figure 1). La pertinence du modèle (R^2) était de 0,681 et sa prédiction (Q^2) de 0,467. Les R^2 et Q^2 pour chaque groupe ont été calculés après 200 permutations (Figures 2 et 3). Les valeurs R^2 et Q^2 des vraies données étant supérieures à celles des données obtenues après permutation, le modèle est considéré comme significatif (Bijlsma, *et al.*, 2012). La figure 1 montre une séparation des deux groupes de foies selon la première variable latente (axe vertical), ainsi les variables qui expliquent le 1^{er} axe permettent de séparer les foies avec des rendements élevés et faibles. 59 variables ont des valeurs VIP supérieures à 2 et 52 d'entre elles sont rattachées à un ou plusieurs métabolite(s). Le tableau 2 récapitule l'information de ces variables. Six métabolites ont un ratio inférieur à 1 (rapport entre foies à rendement élevé et foies à rendement faible), ainsi leur concentration est inférieure dans les foies à rendement élevé. Il s'agit du glucose, du lactate, de l'alanine, de l'ATP, de l'acétate et d'un acide aminé soit la taurine, soit la bétaine. Sept métabolites ont un ratio plus grand que 1 ce qui signifie que leur concentration est supérieure dans les foies à rendement élevé. Ces métabolites sont la choline, la phosphocholine, le glycéro-phosphocholine, le succinate, le myo-inositol, le glycérol et le glutamate ou un composé de sa famille.

Le glucose, le lactate et l'alanine ont un ratio inférieur à 1. L'alanine est un des principaux acides aminés qui sert de précurseurs pour la néoglucogenèse (Yamamoto *et al.* 1974). Ces résultats semblent suggérer un fonctionnement glucidique cellulaire plus faible dans les foies à rendement élevé. La concentration plus faible d'ATP dans ces mêmes foies est en adéquation avec cette hypothèse. Le prélèvement de ces échantillons ayant été effectué à 20 min *pm*, les concentrations des métabolites sont la résultante des concentrations de ces métabolites dans le foie *in vivo* et du début des modifications *post-mortem*. Ainsi la concentration d'ATP qui est bien plus faible dans les foies avec des rendements élevés (ratio = 0,30) suggère un arrêt plus précoce du métabolisme cellulaire dans ces foies après l'abattage des animaux.

La concentration du glutamate est inférieure dans les foies à rendement faible et c'est le contraire pour la concentration de l'alanine. Or, il a été montré qu'une diminution du glutamate et une augmentation de l'alanine entraînaient un profil de catabolisme des protéines dans le muscle de porc (Lopez-Bote *et al.* 2008). Ce résultat suggère que le catabolisme protéique est plus élevé dans les foies à rendement faible. Cette hypothèse a déjà été développée dans le travail de Théron *et al.* (2011).

Il a été montré que le succinate pouvait réduire le stress oxydatif dans des foies stéatosés de souris (Evans *et al.* 2009). La plus forte concentration de succinate dans les foies à rendement élevé montrerait une diminution du stress oxydatif ce qui est aussi en accord avec les hypothèses de Théron *et al.* (2011).

La choline, phosphocholine et glycérophosphocholine sont impliquées dans la synthèse des membranes. Leur concentration supérieure dans les foies à rendement élevé pourrait signifier que les membranes cellulaires des hépatocytes de ces foies ont une meilleure intégrité, ce qui pourrait être mis en relation avec la moindre fonte lipidique au moment de la cuisson.

CONCLUSION

Cette étude a permis de comparer les caractéristiques métaboliques de foies gras avec des rendements technologiques élevés et faibles. Les résultats suggèrent que chez les canards vivants, le catabolisme protéique est plus élevé dans les foies avec des rendements faibles. Dans les foies avec des rendements technologiques élevés, le stress oxydatif semble être plus faible et les membranes cellulaires pourraient avoir une meilleure intégrité. Ces hypothèses renforcent celles qui avaient été émises après l'étude de la fraction protéique de ces mêmes échantillons (Théron *et al.* 2011). Ce travail laisse penser qu'en période *post-mortem*, le métabolisme des foies avec des rendements élevés s'arrêtent plus rapidement car la concentration en ATP est bien plus faible.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beckonert, O., *et al.*, 2007. Nat. Protoc., 2 (11), 2692-2703.
Bijlsma, S., *et al.*, 2006. Anal. Chem., 78(2), 567-574.
Evans, ZP., *et al.*, 2009. Transplant. Proc., 41 (10), 4094-4098.
Lopez-Bote, CJ., *et al.*, 2008. Meat sci., 79 (1), 71-76.
Théron, L., *et al.*, 2011. J. Agric. Food Chem., 59 (23), 12617-28.
Yamamoto, H., *et al.*, 1974. Am. J. Physiol., 226 (6), 1428-1433.

Tableau 1. Rendement technologique et caractéristiques des foies

	Tous les échantillons (n=240)	Rendement élevé (n=13)	Rendement faible (n=12)	p-valeur ^α
Poids de l'animal, g	6287 ± 339	6281 ± 72	6198 ± 92	NS
Poids du foie gras, g	546 ± 96	570 ± 8	582 ± 9	NS
Rendement technologique, %	78,9 ± 13,9	89,9 ± 0,8	68,3 ± 1,3	***
Matière sèche, %	67,9 ± 3,2	67,7 ± 0,3	68,9 ± 0,6	NS
Taux de lipides, % ^β		55,8 ± 0,8	55,6 ± 1,5	NS
pH à 20min <i>pm</i>	5,91 ± 0,11	5,90 ± 0,02	5,84 ± 0,03	NS
L*, à 20 min <i>pm</i>	64,3 ± 2,7	64,9 ± 0,3	62,6 ± 2,2	NS
a*, à 20 min <i>pm</i>	8,5 ± 1,1	8,7 ± 0,2	8,2 ± 0,2	NS
b*, à 20 min <i>pm</i>	33,0 ± 2,4	33,3 ± 0,4	33,9 ± 0,5	NS

^α p-valeur du test de student entre les foies à rendements élevé et faible ; *** p < 0.001 ; NS : Non significatif (p > 0,1)

^β le taux de lipides n'a pas été mesuré pour l'ensemble des échantillons

Tableau 2. Liste des métabolites discriminant (VIP > 2) entre les foies à rendements élevé et faible. Les valeurs des R² et Q² du modèle sont de 0,681 et de 0,467, respectivement.

Annotations	Déplacement chimique	Multiplet ^α	Nb variables	VIP	FC	p-valeur
phosphocholine	4,165-4,185	m	3	3,08	1,48	**
choline	3,205	s	1	4,13	1,25	**
glycérophosphocholine	3,225	s	1	4,22	1,07	0,285
succinate	2,405-2,415	s	2	3,65	1,37	*
myo-inositol	3,595-4,045	m	2	3,30	1,34	**
myo-inositol, choline ^β	4,055	t	1	2,07	1,10	0,054
myo-inositol, glucose, glycerol, lysine ^β	3,615	m	1	2,20	0,93	0,086
glutamate	2,345-2,375	m	4	3,16	1,16	**
glutamate, proline ^β	2,055-2,065	m	2	2,30	1,15	**
glutamine, glutathion ^β	2,125-2,165	m	5	2,40	1,16	0,053
glucose, alanine, glutamine, glutathion, glutamate ^β	3,765-3,785	m	3	2,81	1,06	*
glucose, arginine ^β	3,235	t	1	2,51	1,04	0,508
glucose, serine ^β	3,855	m	1	2,25	1,05	0,095
glycerol	3,645-3,805	m	3	2,66	1,11	*
glycerol, glycine ^β	3,565	m	1	2,56	1,10	*
lysine ^γ	3,755	m	1	2,14	1,05	0,056
alanine	1,475-1,485	d	2	3,46	0,82	*
acetate	1,925	s	1	3,43	0,79	**
ATP	8,565	s	1	2,33	0,30	**
glucose	3,255-3,905	m	7	2,98	0,94	*
	5,225	d	1	2,78	0,84	**
lactate	1,315-1,335	d	3	4,78	0,86	0,060
	4,125	q	1	2,06	0,92	*
phosphocholine, ATP ^β	4,195-4,205	m	2	2,43	0,73	0,055
taurine, betaine ^β	3,265-3,275	t/s	2	4,47	0,89	*

^α d : doublet, m : multiplet, s : singulet, t : triplet

^β Plusieurs métabolites peuvent correspondre au même déplacement chimique.

^γ Tous les pics de la lysine ne sont pas discriminants.

Figure 1. Analyse OPLS-DA : projection des individus sur la première variable latente de l'analyse O-PLSDA (axe vertical). Cet axe permet de séparer les foies à rendement élevé (rond bleu) des foies à rendement faible (étoile noire).

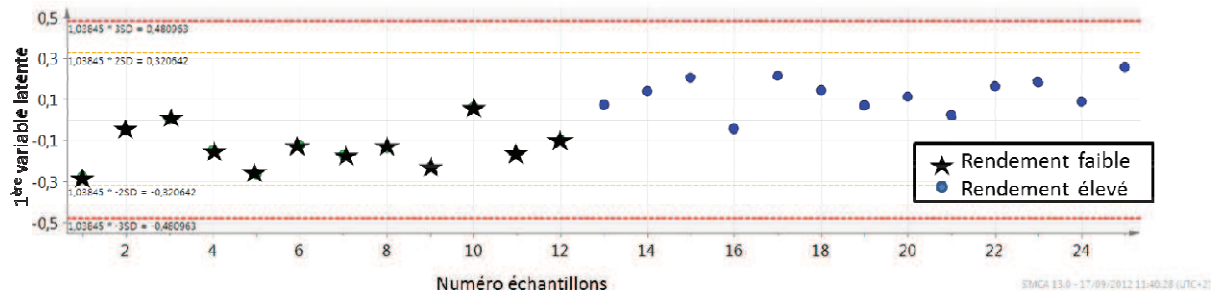


Figure 2. Valeurs des R^2 et Q^2 du modèle après 200 permutations des variables pour les échantillons avec un rendement technologique élevé. Les valeurs obtenues avec les vraies données sont celles de droite. Elles sont supérieures à celles des simulations, d'où la pertinence du modèle.

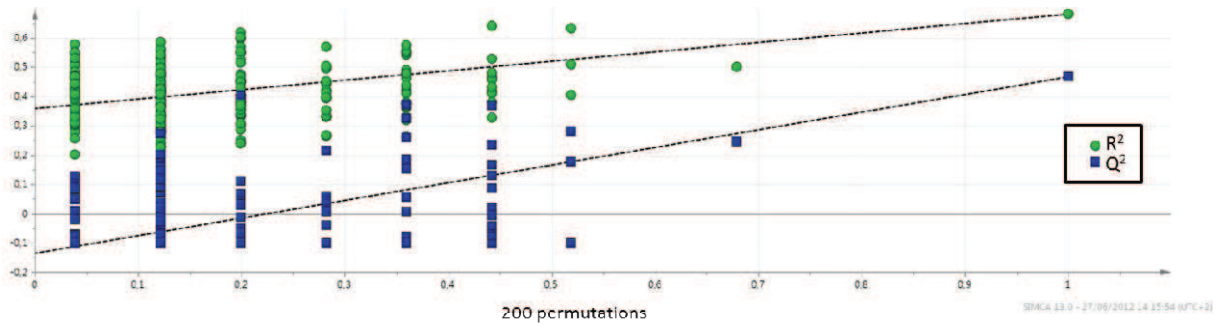


Figure 3. Valeurs des R^2 et Q^2 du modèle après 200 permutations des variables pour les échantillons avec un rendement technologique faible. Les valeurs obtenues avec les vraies données sont celles de droite. Elles sont supérieures à celles des simulations, d'où la pertinence du modèle.

